

UNIVERSITE MONTPELLIER II

SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

N° attribué par la bibliothèque

□ □ □ □ □ □ □ □ □ □

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Ecole Doctorale : SIBAGHE – Systèmes intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences,
Hydrosiences et Environnement

Formation Doctorale : BIMP – Biologie des Interactions Microorganismes Parasitaires

Discipline : Microbiologie et Parasitologie

présentée et soutenue publiquement

par

Elhadji Adakal HASSANE

le 18 Décembre 2009

Titre :

Etude intégrative de la structuration des populations d'*Ehrlichia ruminantium* dans la zone de Békuy, Burkina Faso : application à la formulation d'un vaccin efficace contre la cowdriose

JURY

M. COISSAC Eric, Maître de Conférences, Université Joseph Fourier, Rapporteur

M. FRUTOS Roger, Directeur de Recherche, CIRAD

M. GODELLE Bernard, Professeur, Université Montpellier 2

M. GOURO S. Abdoulaye, Professeur, CIRDES, Bobo-Dioulasso

M. JONGEJAN Frans, Professeur, Université d'Utrecht, Pays-Bas, Rapporteur

M. MARTINEZ Dominique, Chargé de Recherche, CIRAD

M. MORAND Serge, Directeur de Recherche, CNRS, UM 2

« Etude intégrative de la structuration des populations d'*Ehrlichia ruminantium* dans la zone de Békuy, Burkina Faso : application à la formulation d'un vaccin efficace contre la cowdriose »

Au Nom d'ALLAH le Très Miséricordieux,
le Tout Miséricordieux...

...A ma maman, Habsatou ADAM, trop tôt
disparue.

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Dr Frédéric Stachurski sous l'aile de qui, j'ai d'abord appris à connaître *Amblyomma variegatum*, puis à m'intéresser aux autres tiques et aux maladies qu'elles transmettent au bétail. L'accomplissement de ces années d'apprentissage, qui aboutit à cette thèse, est le résultat de la confiance que tu m'as témoignée. Plus qu'un maître, aujourd'hui j'apprécie beaucoup l'ami qui, sans détour, sait remettre sur le droit chemin mes idées égarées. J'espère avoir été à la hauteur de tes attentes, en particulier, celle de « maintenir en vie » au CIRDES, les activités de la section « tiques et les maladies transmises ».

Je remercie très sincèrement le Prof. Abdoulaye S. Gouro, Directeur Général du CIRDES pour m'avoir fait également confiance et m'avoir fortement incité et encouragé à m'engager dans cette thèse.

Je remercie le Dr Issa Sidibé pour son soutien et sa grande disponibilité à l'endroit de tous les jeunes doctorants du CIRDES.

Je remercie mon chef d'unité, le Dr Bengaly Zakaria pour avoir toujours accepté de gérer volontiers en mon absence, tous les dossiers me concernant.

Je remercie grandement mon directeur de thèse, Roger Frutos pour son engagement personnel dans cette thèse, son soutien inconditionnel et surtout pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de cette aventure.

Je remercie mon co-directeur de thèse, Serge Morand qui a toujours su glisser les mots qu'il faut pour me remonter le moral.

Je remercie le Dr Dominique Martinez pour avoir accepté volontiers de m'accueillir à l'UMR15 du CIRAD et à veiller à ce que je ne manque de rien pour réaliser une bonne partie de mes manipulations. Nadège et Denise ont toujours répondu gentille et favorablement à mes sollicitations. Grand merci !

Je remercie vivement les autres membres de mon comité de thèse que je n'ai pas cité ailleurs, en l'occurrence Christine Chevillon, Karine Huber, Nathalie Vachiéry et Finn Kjellberg. La perspicacité de ce comité a su très tôt orienter les grands axes de cette thèse et en faciliter ainsi le parachèvement.

Je remercie vivement le Prof. Frans Jongejan et le Dr Eric Coissac d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que le Prof. Bernard Godelle qui me fait l'honneur d'en présider le jury.

Cette thèse est aussi l'accomplissement de plusieurs années de suivis de terrain. Les principaux acteurs sur le terrain furent les éleveurs des villages de Békuy, Lamba et Sara dont la collaboration sans faille a permis de récolter les nombreux et précieux échantillons qui ont constitué la base des études et des analyses conduites. Qu'ils en soient ici vivement remerciés.

Les résultats obtenus durant cette thèse n'auraient jamais pu voir le jour sans l'aide technique de Maurice Konkobo, Sébastien Zoungrana, Laurent Kaboré, Adrien Zoungrana, Mathias Zerbo, Léopold Millogo. Je vous en suis très reconnaissant.

Je remercie tout le personnel du CIRDES sans exception. Chacun y est allé de son « ça va aller » pour me donner le tonus suffisant pour arriver à cette fin.

Je remercie tous ceux qui ont aidé à atteindre certains des objectifs de cette thèse, tous certes n'ont pas été atteints, et que je ne peux pas tous citer ici car j'en oublierai certainement... A tous, je vous en sais gré.

Je remercie mon père pour l'éducation rigoureuse qu'il m'a donnée et je lui en suis reconnaissant. Je remercie mes frères et sœurs, mes parents qui m'ont toujours fait confiance. Puisse Allah fortifier l'amour filial qui nous lie et qui donne au mot famille, tout son sens à nos yeux.

Je remercie mon épouse Souliyatou pour l'amour qu'elle me donne, pour sa bonté et sa patience exemplaires et mes deux enfants, Riyanatou et Mouhamadoul-Amine pour être ma source d'inspiration et la lumière qui guide mes pas. Votre soutien permanent et particulièrement pendant les dix derniers jours qui ont précédé le dépôt de l'annexe A (qui signe l'engagement pour la soutenance et en confirme la date) ont été déterminants. Sur l'autorisation de mes chefs, j'ai émigré de mon bureau officiel à ma chambre de débarras que j'ai transformé en bureau de fortune pour achever cette thèse. Sans votre présence, je n'y serai jamais arrivé. Qu'Allah veille sur vous !

Ces travaux ont été financés par des projets européens INCO de recherche sur la cowdriose, le Fonds de solidarité Prioritaire Appui institutionnel au CIRDES, le CIRDES, le CIRAD et l'AUF.

Table des matières

Introduction	12
PREMIERE PARTIE	15
Revue bibliographique : Etat de l'art et contexte scientifique	15
1 <i>Ehrlichia ruminantium</i> , agent de la cowdriose	16
1.1 Classification	16
1.2 Morphologie, localisation, cycle évolutif et culture	16
2 Epidémiologie de la cowdriose	20
2.1 Répartition géographique	20
2.2 La transmission vectorielle.....	21
2.3 Les espèces animales affectées.....	22
3 Etude clinique	23
3.1 Signes cliniques.....	23
3.2 Lésions	24
3.3 Diagnostic.....	25
3.4 L'immunité anti-cowdrienne	28
3.5 Variation antigénique	28
4 Contrôle de la maladie	29
4.1 Le traitement	29
4.2 La lutte contre les tiques.....	30
4.3 L'équilibre naturel ou stabilité enzootique.....	30
4.4 Prophylaxie vaccinale.....	31
4.4.1 L'immunisation par « infection-traitement ».....	32
4.4.2 Le vaccin vivant atténué	32
4.4.3 Le vaccin inactivé.....	33
4.4.4 Le vaccin à ADN recombinant	34
4.5 Caractéristiques génomiques d' <i>Ehrlichia ruminantium</i>	35
4.6 Epidémiologie moléculaire de la cowdriose.....	37
5 Bref aperçu sur l'Elevage Burkinabè	41
6 Tiques et cowdriose au Burkina Faso	44

CHAPITRE 1	46
Essais vaccinaux et problèmes de protection croisée : Impact de la diversité génétique d' <i>E. ruminantium</i> sur l'efficacité de vaccins inactivés	46
1 Objectif de l'étude.....	47
2 Délimitation de la zone géographique	47
3 Essais de protection croisée : Identification des souches de challenge.....	48
4 Stratégie vaccinale	48
5 Conclusions.....	51
DEUXIEME PARTIE	53
Les tiques et les méthodes de contrôle au Burkina Faso.....	53
CHAPITRE 2 :	54
Efficacité des méthodes courantes de lutte contre les tiques au Burkina Faso	54
1 Contexte d'étude	54
2 Objectifs de l'étude	55
3 Conclusions.....	57
CHAPITRE 3	58
Développement de stratégies alternatives de lutte intégrée contre les tiques.....	58
1 Contexte d'étude	58
2 Objectifs de l'étude	60
3 Rythme de détachement des nymphes gorgées d' <i>A. variegatum</i>	60
4 Conclusions.....	62
CHAPITRE 4	63
Dynamique d'infestation des tiques dans la zone de Békuy	63
1 Contexte d'étude	63
2 Objectifs de l'étude	63
3 Zone d'étude et plan d'échantillonnage	64
4 Evaluation de la prévalence d' <i>E. ruminantium</i> chez <i>A. variegatum</i>	67
5 Résultats	68
5.1 Abondance des tiques récoltées.....	68
5.2 Evolution mensuelle et saisonnière de l'infestation par les différents genres.....	70
5.3 Variation du niveau d'infestation selon les villages et les espèces animales	72
5.4 Suivi longitudinal dans le village de Bekuy	76
5.5 Prévalence d' <i>E. ruminantium</i> chez <i>A. variegatum</i>	77
6 Discussion	79

7 Conclusion	83
TROISIEME PARTIE.....	84
Analyse de la diversité génétique d' <i>E. ruminantium</i> : Structure et profils évolutifs des populations du Burkina Faso.....	84
CHAPITRE 5	85
Sous-chapitre 1 : Développement et validation d'un schéma MLST pour <i>E. ruminantium</i>	85
1 Contexte d'étude	85
2 Objectifs de l'étude	85
3 Développement et validation d'un schéma MLST pour <i>E. ruminantium</i>	86
4 Identification des gènes cibles	86
5 Vérification de l'identité des souches analysées.....	88
6 Conclusions.....	91
Sous-chapitre 2 : Origine clonale des populations émergentes d' <i>E. ruminantium</i>	93
1 Contexte d'étude	93
2 Conclusions.....	94
Conclusion générale	96
Perspectives	98
1 Développement de vaccin local contre la cowdriose	98
2 Le développement des méthodes de lutte contre les tiques, complémentaires des méthodes existantes.....	98
3 La surveillance de l'expansion de <i>Boophilus microplus</i> en Afrique de l'Ouest.....	99
4 L'étude de la résistance des tiques aux acaricides en Afrique de l'Ouest	100
Références bibliographiques	101
Annexes	112

Liste des figures

Figure 1 : Classification d' <i>Ehrlichia ruminantium</i> (reproduit de (Marcelino, 2007) adapté de (Dumler et al., 2001; Kocan et al., 2003).....	17
Figure 2 : Distribution potentielle d' <i>A. variegatum</i> en Afrique (Walker et al., 2003).....	20
Figure 3 : Distribution potentielle d' <i>E. ruminantium</i> et de la cowdriose (Allsopp, 2009).....	20
Figure 4 : Evolution du nombre de pédiluves installés au Burkina de 1998 à 2007. Données non publiées, F. Bouyer et al, 2009).....	59
Figure 5 : Localisation des villages de Békuy, Lamba et Sara dans la zone d'étude.	65
Figure 6 : Evolution de l'infestation par les adultes d' <i>A. variegatum</i> des troupeaux suivis dans les trois villages en 2007 et 2008.....	71
Figure 7 : Relation entre le nombre de tiques des différents genres et la pluviométrie (R^2 = coefficient de détermination ; r = coefficient de corrélation).....	75
Figure 8 : Répartition des gènes cibles sur le génome d' <i>E. ruminantium</i> (souche Gardel)	89

Liste des tableaux

Tableau I : Distribution globale des tiques adultes (toutes espèces confondues) récoltées au cours des suivis 2007 et 2008 en fonction des villages	69
Tableau II : Distribution globale des tiques adultes (toutes espèces confondues) récoltées au cours des suivis 2007 et 2008 en fonction de l'espèce hôte	69
Tableau III : Distribution globale des nymphes d' <i>A. variegatum</i> récoltées au cours des suivis 2007 et 2008 en fonction des villages	69
Tableau IV : Distribution globale des nymphes d' <i>A. variegatum</i> récoltées au cours des suivis 2007 et 2008 en fonction de l'espèce hôte	69
Tableau V : Evolution moyenne de l'infestation par les tiques récoltées dans les troupeaux des trois villages suivis en 2007 et 2008 (tout hôte animal considéré).....	73
Tableau VI : Proportions des tiques adultes des différents genres identifiés en fonction des villages..	74
Tableau VII : Proportions des tiques adultes des différents genres identifiés en fonction de l'animal hôte	74
Tableau VIII : Différentes espèces de tiques identifiées et leurs proportions dans l'échantillon.....	76
Tableau IX : Prévalence en pourcentage (%) d' <i>Ehrlichia ruminantium</i> en fonction de la stase d' <i>A. variegatum</i> et en fonction des villages	78
Tableau X : Prévalence en pourcentage (%) d' <i>Ehrlichia ruminantium</i> en fonction de la stase d' <i>A. variegatum</i> et en fonction de l'animal hôte.....	78
Tableau XI : Caractéristiques des gènes cibles ainsi que les amorces utilisées pour l'analyse.....	90

Liste des photos

Photo 1 : Amas d' <i>E. ruminantium</i> accolé au noyau de la cellule endothéliale d'un capillaire cérébral après écrasement de cortex (cliché, Adakal 2002)	19
Photo 2 : Culture cellulaire d' <i>E. ruminantium</i> sur des lignées de cellules aortiques bovines. On peut remarquer la formation de la vacuole intracytoplasmique ou morula. Cliché, Adakal 2002.	19
Photo 3 : Mâle et femelle d' <i>A. variegatum</i> , Cliché F. Stachurski	20
Photo 4 : Hydropéricarde chez un animal mort de cowdriose (cliché, Adakal 2002)	24
Photo 5 : Hydrothorax chez un animal mort de cowdriose (cliché, Adakal 2002).....	25
Photo 6 : Bélier sahélien de race Bali-bali, (cliché M. Sangaré, 2008).....	43
Photo 7 : Bélier de race Djallonké, (cliché M. Sangaré, 2008)	43
Photo 8 : Troupeau de moutons suivis lors des essais vaccinaux dans le village de Sara.....	49
Photo 9 : Séance de vaccination sur le terrain, ici dans le village de Lamba	49
Photo 10 : Séance de collecte de tiques, l'animal est immobilisé et entièrement détiqué, cliché Adakal, 2007.....	67

Liste des abréviations

MRA :	Ministère des Ressources Animales
MLST :	Multilocus Sequence Typing
ARNr :	Acide Ribonucléique ribosomal
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
kDA :	Kilodalton
MAP1 :	Major Antigenic Protein 1
PCR:	Polymerase Chain Reaction
RLB:	Reverse Line Blot hybridization
MLEE:	Multilocus Enzyme Electrophoresis
pb:	Paire de bases
CC:	Complexe clonal
RAPD :	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism
IBET :	Instituto de Biologia Experimental e Tecnologica
CIRDES :	Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide
CIRAD :	Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
FAO:	Food and Agriculture Organization of the United Nations
ARIOPE :	Projet d'Appui au Renforcement Institutionnel des Organisations Professionnelles d'Éleveurs
PAEOB :	Projet d'Appui à l'Élevage dans l'Ouest du Burkina Faso
ST :	Séquence type
AUF :	Agence Universitaire pour la Francophonie
IRD :	Institut de Recherche et Développement
LANADA :	Laboratoire National d'Appui au Développement Agricole

Introduction

La cowdriose est une maladie due à l'action pathogène d'*Ehrlichia ruminantium* (Dumler *et al.*, 2001), une rickettsie intracellulaire obligatoire, précédemment connue sous le nom de *Cowdria ruminantium* (Moshkovski, 1947). La maladie est transmise par les tiques du genre *Amblyomma* aux ruminants domestiques (chèvres, moutons, bovins) et sauvages (antilopes, girafes, buffles) et à certaines espèces de rongeurs (Peter *et al.*, 2002a).

Sur le plan clinique, la cowdriose est une maladie infectieuse, virulente, non contagieuse, caractérisée par une forte hyperthermie suivie de troubles respiratoires et nerveux et des lésions d'hydropéricarde et d'hydrothorax. L'évolution et le pronostic de la maladie sont fonction de la race, de l'espèce, de l'âge de l'animal mais surtout de la virulence de la souche infectante. La maladie sévit à l'état enzootique en Afrique au Sud du Sahara, aux Comores, à Madagascar, dans les îles Mascareignes (île de la Réunion et île Maurice) et dans certaines îles des Antilles (Guadeloupe, Marie Galante et Antigua) d'où elle constitue une menace pour le continent américain (Barré *et al.*, 1987).

Son importance est mal connue car la rapide évolution de la maladie ne permet pas de poser le diagnostic avant la mort de l'animal. L'infection par *Ehrlichia ruminantium* chez les races bovines européennes *Bos taurus*, peut conduire à une mortalité pouvant atteindre 80% (Uilenberg, 1983). La cowdriose constitue donc une des contraintes majeures à l'amélioration génétique des races locales par l'importation et le croisement avec des races exotiques. Or, depuis quelques années, certains pays d'Afrique de l'Ouest comme le Burkina Faso ont mis en place des programmes d'amélioration génétique afin d'augmenter la production laitière par l'importation de races bovines de pays européens (MRA, 2003).

Pour limiter l'impact de la cowdriose, il n'existe à ce jour, qu'un seul vaccin vivant commercial utilisé principalement en Afrique du Sud mais qui possède un grand nombre d'inconvénients : la protection croisée qu'il confère sur le terrain est limitée, et de par sa nature, le vaccin peut être une source de transmission d'autres pathogènes et exige une chaîne de froid pour sa conservation.

Dans ces conditions, les seuls moyens disponibles pour les services vétérinaires et l'éleveur en zone d'enzootie restent la lutte contre les tiques pour réduire la transmission du pathogène et le traitement à l'oxytétracycline lorsque le diagnostic de la maladie est posé suffisamment tôt avant l'apparition des signes nerveux qui précèdent la mort de l'animal. Le développement d'un vaccin efficace reste alors la seule alternative qui autorisera les déplacements des animaux performants des zones indemnes vers des zones d'enzootie. Or, la mise en place de vaccin efficace est entravée par la diversité génétique qui existe dans les populations naturelles d'*Ehrlichia ruminantium* qui fait que des animaux vaccinés avec une souche donnée ne sont pas forcément protégés lorsqu'ils sont exposés à un challenge naturel par les tiques sauvages, même lorsque celui-ci a lieu dans la zone d'origine de la souche vaccinale. Les expériences non concluantes d'essais vaccinaux sur le terrain sont nombreuses à ce titre (Faburay *et al.*, 2007a; Pretorius *et al.*, 2008), et ce, quel que soit le type de vaccin utilisé.

Afin de mieux appréhender la diversité génétique d'*Ehrlichia ruminantium* et aider au développement de vaccin efficace contre la cowdriose, il paraît essentiel d'étudier la structuration de ses populations naturelles. Une telle approche nécessite de disposer de marqueurs biologiques pertinents. Ce travail de thèse a ainsi pour objectif principal d'aider à la mise en place d'outils performants qui permettent de mieux caractériser l'agent pathogène et d'étudier l'épidémiologie de la cowdriose à l'échelle moléculaire. La cowdriose étant une maladie à transmission vectorielle, son contrôle ne peut être envisagé sans la prise en compte de l'interaction qui existe entre l'agent causal et son vecteur. Ainsi, un second aspect abordé dans cette thèse, est la compréhension, un temps soit peu, de la dynamique commune d'*E. ruminantium* et d'*A. variegatum* dans une logique de lutte intégrée et d'établissement d'une stabilité enzootique pour la cowdriose.

Après une revue bibliographique indispensable pour connaître le pathogène, son vecteur et la maladie dont sont responsables ces deux acteurs, nous présenterons les limites des méthodes de lutte actuelles et les raisons de leur inefficacité sur le terrain. Ensuite, dans le corps de cette thèse, nous aborderons successivement les sujets suivants, à la suite desquels sont intégrées les publications afférentes:

- en premier lieu, les problèmes posés par la diversité génétique d'*E. ruminantium* sur les protections croisées des souches et l'efficacité de vaccins inactivés sur le terrain sont évoqués dans le **chapitre 1**;
- les moyens de lutte couramment utilisés par les éleveurs du Burkina Faso pour contrôler l'impact des tiques et leur efficacité sur le terrain sont examinés dans le **chapitre 2**;
- dans le **chapitre 3**, une proposition de méthode de lutte, intégrée et complémentaire des méthodes existantes est faite pour contrôler l'infestation des animaux par le vecteur de la cowdriose;
- ensuite le **chapitre 4** introduit le plan d'échantillonnage adopté pour l'étude de la diversité génétique d'*E. ruminantium* en mettant l'accent sur la dynamique du vecteur ;
- l'étude de la diversité proprement dite, cœur de sujet de cette thèse, est abordée dans le **chapitre 5** qui, dans un premier sous-chapitre, décrit la validation du schéma MLST appliqué à un échantillon réduit et dans un second sous-chapitre, confirme les résultats précédemment obtenus sur un échantillon plus représentatif ;
- enfin, nous évoquons en guise de perspectives, quelques éléments et considérations qu'imposent les résultats de l'étude de la diversité génétique d'*E. ruminantium*.

PREMIERE PARTIE

Revue bibliographique : Etat de l'art et contexte scientifique

1 *Ehrlichia ruminantium*, agent de la cowdriose

1.1 Classification

La cowdriose est due à l'action pathogène d'une rickettsie appelée jusqu'à récemment *Cowdria ruminantium* (Moshkovski, 1947) du nom de Cowdry qui l'a mise en évidence dans les tissus des tiques et d'animaux infectés. Elle appartenait alors à la tribu des Ehrlichieae et au genre *Cowdria*, comptant comme seule espèce, *Cowdria ruminantium*. Des analyses phylogénétiques réalisées par Dumler et al., (2001) ont montré que le genre *Cowdria* a des homologies de séquences d'ARNr 16S avec d'autres espèces d'*Ehrlichia* (*E. canis*, *E. chaffeensis*). Ils ont ainsi reclassé la rickettsie dans la classe des Protéobactéries, dans l'ordre des Rickettsiales, et dans la famille des Anaplasmataceae, ensemble avec les genres *Anaplasma*, *Neorickettsia* et *Wolbachia* (**figure 1**).

1.2 Morphologie, localisation, cycle évolutif et culture

La rickettsie est décrite comme un microorganisme intracellulaire obligatoire, Gram négatif, de forme coccoïde ou ellipsoïdale, souvent polymorphe. L'examen en microscopie électronique indique deux formes morphologiques distinctes, une forme pléomorphe plus grande (0,4 à 0,6µm x 0,7 à 1,9µm) présentant des filaments nucléiques dispersés ou corps réticulés et une forme plus petite (0,4 à 0,6µm) ayant les filaments nucléiques condensés ou corps élémentaires. A l'intérieur de la cellule endothéliale, les microorganismes apparaissent sous forme d'amas, localisés dans des vacuoles intracytoplasmiques (morulas) généralement accolés au noyau. La forme infectante du pathogène est représentée par les corps élémentaires. Ainsi après infection de l'hôte, il est admis que les corps élémentaires sont d'abord acheminés vers les nœuds lymphatiques périphériques drainant le point de piqure de la tique (Camus *et al.*, 1996) pour se localiser quelques jours plus tard, dans le cytoplasme des neutrophiles circulants, puis dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, sous forme de morulas (Logan *et al.*, 1987). Cette phase coïncide avec l'apparition chez l'hôte, des signes cliniques dont le premier est l'hyperthermie (Du Plessis, 1970). Dans l'endothélium vasculaire, à la suite de scissions binaires successives, les morulas évoluent en corps réticulés qui constituent la forme métaboliquement active mais non infectieuse. L'augmentation en

nombre entraîne l'éclatement de la morula et la libération dans la circulation générale, de corps élémentaires, responsables de l'initiation d'un nouveau cycle, infectant différents organes internes tels que le cerveau, les poumons, les reins, le foie, la rate, les nœuds lymphatiques (Camus *et al.*, 1996).

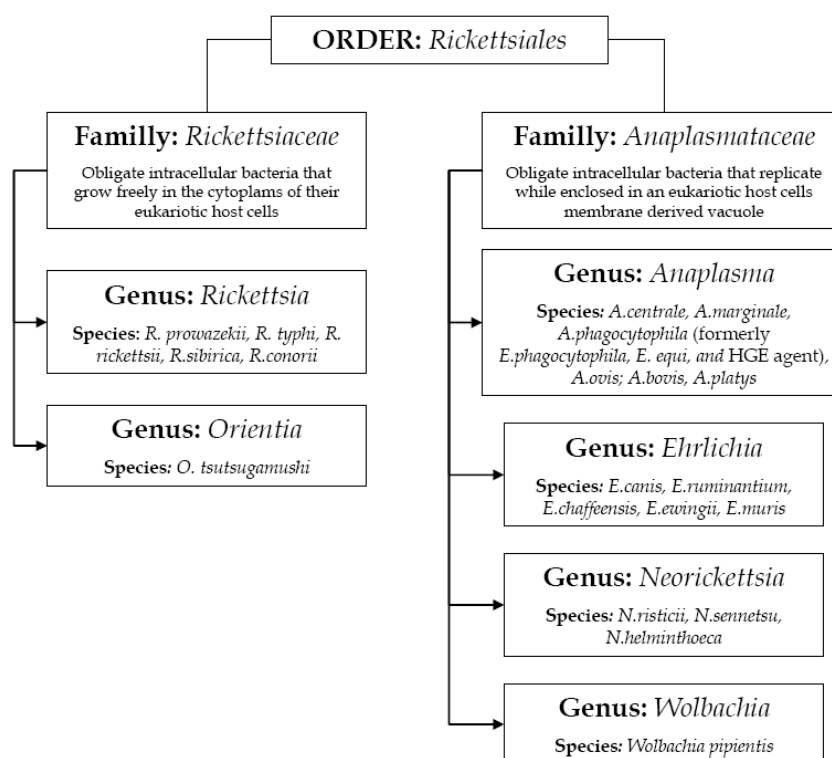


Figure 1 : Classification d'*Ehrlichia ruminantium* [reproduit de Marcelino, (2007) adapté de Dumler et al., (2001; Kocan et al., (2003)].

Chez l'hôte infecté, le pathogène est plus facilement détectable dans les cellules endothéliales des vaisseaux capillaires du cortex cérébral (Cowdry, 1925), ce qui en fait la base du diagnostic direct de la cowdriose (voir Diagnostic). Une fois infecté, l'hôte peut rester porteur du germe pendant 42 mois (3 ans et demi) et constituer ainsi un réservoir pour l'infection d'autres tiques (Andrew et Norval, 1989; Bekker *et al.*, 2002; Camus, 1992).

La tique s'infecte en prenant son repas sanguin sur un animal infecté. La mise en évidence de différentes formes morphologiques du pathogène dans les glandes salivaires et l'intestin des tiques infectées suggère que le pathogène subit également un cycle de

développement dans la tique, et que la transmission à l'hôte se fait par régurgitation du contenu intestinal et/ou par sécrétion salivaire au moment du repas sanguin (Bezuidenhout, 1981). Le passage de l'intestin aux glandes salivaires est probablement assuré par les hémocytes dans lesquels le pathogène a été observé (Du Plessis, 1985). La transmission du pathogène est transstadiale et une infection acquise au stade larvaire peut persister jusqu'au stade adulte même si la nymphe se nourrit sur un animal non sensible. La transmission transovarienne, mise en évidence dans des conditions expérimentales chez *Amblyomma hebraeum* (Bezuidenhout et Jacobsz, 1986), ne semble pas jouer un rôle dans la transmission naturelle de l'infection. Les tiques ne constituent pas de ce fait un réservoir pour le pathogène. La transmission verticale de la vache au veau a été décrite par Deem *et al.*, (1996) mais son rôle dans l'épidémiologie de la maladie n'est également pas élucidé.

La première culture d'*E. ruminantium* a été réalisée sur des lignées de cellules endothéliales de veau (E5) (Bezuidenhout *et al.*, 1985). Actuellement la culture de la rickettsie se fait en routine sur des cellules endothéliales de mammifères domestiques (bovins, ovins, caprins) ou sauvages (Smith *et al.*, 1998) et plus étonnamment sur des cellules endothéliales ombilicales humaines (Totte *et al.*, 1993).

Chez les tiques, vectrices ou non, des cellules d'*A. variegatum*, d'*Ixodes scapularis*, d'*I. ricinus*, de *Boophilus decoloratus*, de *B. microplus*, de *Rhipicephalus appendiculatus* ont été utilisées pour isoler et multiplier l'agent pathogène (Bell-Sakyi, 2004; Bell-Sakyi *et al.*, 2000). Marcelino *et al.*, (2005) ont récemment décrit avec plus de précisions, la cinétique de la réplication de l'ADN d'*E. ruminantium* dans les cellules endothéliales. Ils ont montré que la multiplication d'*E. ruminantium* est exponentielle entre 36 et 108 heures post-infection (pi), que le rendement est maximal à 113h pi et que le moment idéal pour effectuer les passages est à 120h pi car le caractère infectieux d'*E. ruminantium* est plus prononcé à ce moment. Ces avancées majeures ouvrent des perspectives pour le développement de vaccins par la production en masse d'antigènes des différents isolats.



Photo 1 : Amas d'*E. ruminantium* accolé au noyau de la cellule endothéliale d'un capillaire cérébral après écrasement de cortex (cliché, Adakal 2002)



Photo 2 : Culture cellulaire d'*E. ruminantium* sur des lignées de cellules aortiques bovines. On peut remarquer la formation de la vacuole intracytoplasmique ou morula. Cliché, Adakal 2002.

2 Épidémiologie de la cowdriose

2.1 Répartition géographique

La première description de la cowdriose et de son vecteur a été faite en Afrique du Sud, en 1838 par Louis Trichard. Les travaux pionniers de recherche sur la maladie (étiologie, mode de transmission, pathogénie...) furent naturellement menés en Afrique du Sud (Alexander, 1931; Hutcheon, 1900). C'est seulement à partir du début du 20^{ième} siècle que la maladie a été décrite dans la plupart des pays de l'Afrique au sud du Sahara (Camus *et al.*, 1996), dans de nombreuses îles (Comores, Sao Tomé, Zanzibar, Madagascar), dont les Antilles Françaises (Guadeloupe, Marie Galante et Antigua) et les îles Mascareignes (Réunion et Ile Maurice).



Figure 2 : Distribution potentielle d'*A. variiegatum* en Afrique (Walker *et al.*, 2003)

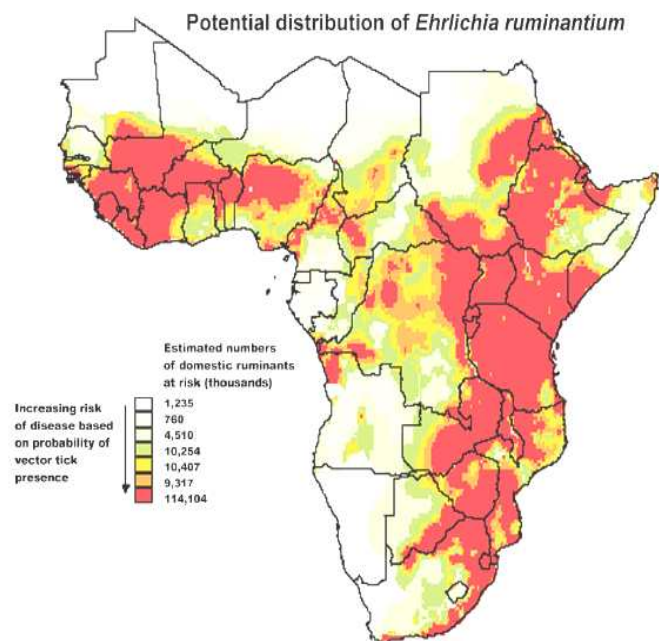


Figure 3 : Distribution potentielle d'*E. ruminantium* et de la cowdriose (Allsopp, 2009)

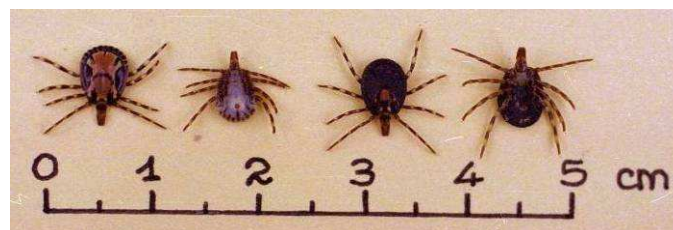


Photo 3 : Mâle et femelle d'*A. variiegatum*, Cliché F. Stachurski

2.2 La transmission vectorielle

La transmission naturelle de l'infection se fait uniquement par des tiques du genre *Amblyomma* qui renferme plus de 100 espèces dont une douzaine serait impliquée dans la transmission (Camus *et al.*, 1996; Uilenberg, 1982a; Walker et Olwage, 1987). *A. variegatum* est le principal vecteur d'*E. ruminantium* en Afrique (**photo 3** et **figure 2**), excepté en Afrique australe où *A. hebraeum* est probablement le seul vecteur naturel. L'importance de ces deux espèces est également liée à leur large spectre d'hôtes. En effet, les stades immatures se nourrissent sur les ruminants mais aussi volontiers sur les oiseaux, les reptiles et les petits mammifères tandis que les adultes parasitent essentiellement les bovidés. La tique *A. variegatum* a un cycle de développement à trois hôtes. Chacune des stases (larve, nymphe ou adulte), prend son repas de sang sur un hôte différent. Elle tombe au sol après gorgement pour se métamorphoser (larve et nymphe) et retrouver un nouvel hôte, ou pour pondre (femelle adulte). La durée du repas sanguin est d'environ 4 à 20 jours pour les larves, 5 à 20 jours pour les nymphes et de 10 à 20 jours pour les femelles, tandis que les mâles peuvent rester fixés sur les animaux pendant 3 mois. Ce cycle est influencé, dans les régions tropicales, par l'existence de deux saisons distinctes: une saison sèche et une saison des pluies. En effet, la pluviométrie conditionne l'activité des stades adultes qui infestent les animaux principalement en début de saison de pluies (mai-juillet) bien qu'on puisse les observer pendant toute la saison (jusqu'à mi-octobre). Les larves infestent les animaux en fin de saison des pluies tandis que les nymphes ne se gorgent qu'en début de saison sèche et sont présentes durant cette période pendant environ quatre mois (d'octobre à janvier) avec un pic d'infestation au mois de novembre. La métamorphose intervient en 4 à 7 semaines en fonction des conditions de température et d'hygrométrie (Stachurski, 2000b). Les adultes à jeun subissent une diapause comportementale jusqu'à l'arrivée de nouvelles pluies. Aussi chez les petits ruminants, la cowdriose, transmise par les nymphes et les adultes, apparaît-elle en zone tropicale au moment des pics d'infestation par les adultes (mai à septembre) mais surtout par les nymphes (octobre-novembre).

D'autres tiques du genre *Amblyomma* peuvent être vectrices de la cowdriose : *A. lepidum* au Soudan, *A. astrion* sur les îles de Sao Tomé et Príncipe, et *A. pomposum* en Angola. Cinq autres espèces africaines sont capables de transmettre l'agent infectieux aux animaux de laboratoire, mais n'ont pas été impliquées dans des cas de cowdriose sur le terrain : *A. cohaerens*, *A. gemma*, *A. tholloni*, *A. sparsum* et *A. marmoreum* (Walker et

Olwage, 1987). La propagation de la maladie des îles des Caraïbes au continent Américain est un risque en raison de la présence de vecteurs potentiels « autochtones » et/ou de l'établissement sur ce continent des tiques exotiques (*A. marmoreum* et *A. sparsum*) introduites en Floride (Burridge *et al.*, 2000). Parmi les espèces « autochtones » seul *A. maculatum* semble expérimentalement transmettre l'agent pathogène mais pas *A. americanum* et *A. cajennense* (Mahan *et al.*, 2000).

2.3 Les espèces animales affectées

Tous les ruminants domestiques sont potentiellement sensibles à la cowdriose, notamment les moutons, les chèvres, les bovins (*Bos taurus* ou *Bos indicus*) (Camus *et al.*, 1996). Dans la faune sauvage, l'infection par *E. ruminantium* a été prouvée chez 12 espèces de ruminants d'Afrique (Peter *et al.*, 2002a): le buffle d'Afrique (*Syncerus caffer*), le gnou noir (*Connochaetes gnou*), le gnou bleu (*Connochaetes taurinus*), le bontebok (*Damaliscus pygargus*), l'éland du Cap (*Taurotragus oryx*), la girafe (*Giraffa camelopardalis*), le grand koudou (*Tragelaphus strepsiceros*), l'hipotrague noir (*Hippotragus niger*), le cobe de Lechwe (*Kobus leche kafuensis*), le Guib d'eau ou Sitatunga (*Tragelaphus spekii*), l'euchore (*Antidorcas marsupialis*), le Steenbok (*Raphicerus campestris*). Chez trois espèces non Africaines, le cerf de Virginie/cariacou (*Odocoileus virginianus*), le chital ou cerf axis (*Axis axis*), le cerf Rusa ou cerf de Timor (*Cervus timorensis*), l'infection a été mise en évidence ainsi que chez deux espèces de rongeurs (*Rhabdomys pumilio*) et (*Mastomys coucha*). L'état de portage subclinique a été mis en évidence chez huit de ces espèces. Toutefois, le principal réservoir sauvage serait constitué par les buffles (*Syncerus caffer*) qui, après infection, peuvent rester porteurs du germe durant des mois et peut-être durant toute leur vie (Euzeby, 2001). La connaissance de la gamme d'espèces d'animaux sauvages chez lesquels la transmission d'*E. ruminantium* est possible, est un pré-requis pour mieux apprécier la dynamique de transmission du pathogène chez les animaux domestiques vivant en zone d'enzootie mais également pour évaluer le risque de transmission de la maladie chez les animaux importés des zones indemnes. Des stratégies de régulation de mouvements d'animaux transfrontaliers peuvent alors être plus facilement développées.

L'aspect zoonotique de la cowdriose a fait l'objet de spéculation depuis que Totte *et al.*, (1993) avaient montré l'aptitude d'*E. ruminantium* à se développer sur des cellules humaines.

Récemment, trois cas d'infection chez l'homme par *E. ruminantium* ont été rapportés en Afrique du Sud (Allsopp, 2005). Les signes cliniques décrits chez ces personnes (encéphalite, symptômes nerveux...) sont semblables à ceux observés chez les animaux faisant de la cowdriose. Même si l'ADN d'*E. ruminantium* a été mis en évidence sur les sérums prélevés, les preuves d'une piqûre de tique n'ont pu être établies.

3 Etude clinique

3.1 Signes cliniques

Dans la nature, l'infection chez les ruminants ne se produit qu'après un temps minimal de fixation des tiques compris entre 27 et 38 heures pour les nymphes et 21 et 75 heures pour les adultes (Euzeby, 2001). L'incubation qui s'ensuit est en moyenne de 14 jours lorsque la transmission se fait par les nymphes et 21 jours lorsqu'il s'agit des adultes (Neitz, 1968). Cette durée est donc naturellement plus courte lorsque l'infection se fait à travers une inoculation, généralement par voie intraveineuse, de matériel infecté (sang, culture) car le pathogène, déjà virulent, n'a pas besoin d'activation métabolique comme cela a lieu dans la tique. A la suite de l'incubation, survient presque toujours une fièvre brutale (supérieure à 41°C). L'évolution peut se faire sous quatre formes en fonction du pouvoir pathogène des souches d'*E. ruminantium*. Dans la forme suraigüe, d'évolution très brutale, la mort survient en quelques heures, sans que les symptômes aient le temps de se développer, « l'animal laissé en pleine forme la veille, est trouvé mort le lendemain ». La forme aigüe évolue sur 2 à 6 jours et débute par une forte hyperthermie suivie par de l'anorexie, une détresse respiratoire intense due à un œdème pulmonaire et des signes nerveux en phase terminale. Les symptômes nerveux se caractérisent par des tremblements localisés des muscles, puis des tremblements généralisés, une ataxie, des mouvements en cercle, des attitudes anormales, des poussées au mur et parfois de l'agressivité. Ultérieurement, les animaux tombent et restent en décubitus latéral. Ils présentent des crises de pédalage, de l'opisthotonos, des grincements des dents, des mouvements désordonnés de la bouche et des yeux et, après 3 à 5 jours d'évolution, la température chute brutalement et la mort est fréquente. Les signes digestifs, plus fréquents chez les bovins que chez les petits ruminants, consistent en une diarrhée profuse et sanguinolente en raison d'une entérite. Dans la forme subaigüe, les symptômes sont

semblables à ceux observés dans la forme aiguë, mais sont moins prononcés. L'animal peut succomber ou guérir de la maladie. Enfin, la forme inapparente évolue sans signes perceptibles, limités à une fièvre transitoire, souvent non détectable sur le terrain. Dans ce cas, les animaux guérissent et acquièrent une immunité solide. C'est le cas des jeunes animaux qui possèdent encore, au moment de leur premier contact avec le vecteur et l'agent pathogène, une résistance innée due à l'âge (Camus *et al.*, 1996). Cette forme est également rencontrée chez les animaux autochtones bénéficiant d'un état de stabilité enzootique.

3.2 Lésions

Les lésions sont plus importantes dans la forme aiguë et sont d'ordre macroscopique et microscopique. A l'autopsie, les lésions sont caractérisées par des épanchements rarement hémorragiques dans les cavités péricardique et thoracique, qualifiés d'hydropéricarde et d'hydorthorax (**Photos 1 et 2**), ce qui a d'ailleurs valu à la maladie son nom anglais de «heartwater» (Camus *et al.*, 1996).



Photo 4 : Hydropéricarde chez un animal mort de cowdriose (cliché, Adakal 2002)



Photo 5 : Hydrothorax chez un animal mort de cowdriose (cliché, Adakal 2002)

Les lésions nerveuses sont souvent discrètes (congestion des méninges), mais on note une congestion plus importante des poumons, du médiastin et des nœuds lymphatiques et, fréquemment, une congestion du foie et une splénomégalie. Un œdème aigu du poumon est observé dans les formes suraiguës et des lésions d'entérite sont visibles lors de formes digestives. Les lésions histologiques sont discrètes mais les plus pathognomoniques sont la présence d'amas de rickettsies dans l'endothélium des vaisseaux. L'observation de ces amas dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux permet de poser un diagnostic de certitude sur un animal mort.

3.3 Diagnostic

Le diagnostic clinique est difficile en raison de l'évolution rapide de la maladie, de l'absence fréquente de signes cliniques pathognomoniques, et parfois même de l'absence de lésions caractéristiques. Toutefois, on suspectera la cowdriose devant un animal présentant une température corporelle très élevée, des troubles respiratoires, des troubles nerveux, le tout évoluant brutalement vers la mort en 2 à 5 jours après le début de l'hyperthermie. A

l'autopsie, un hydrothorax et ou un hydropéricarde sont généralement présents, renforçant ainsi la suspicion. Ces données cliniques doivent obligatoirement être reliées à des données épidémiologiques : présence ou absence du vecteur, survenue d'un précédent épisode semblable...etc avant de confirmer le diagnostic.

Le diagnostic direct ante-mortem peut se faire par l'inoculation du sang des animaux suspects à des petits ruminants sains, mais cette méthode doit être abandonnée dans un contexte de protection des animaux. Chez l'animal mort, le diagnostic est possible par la mise en évidence des morulas dans le cytoplasme des cellules endothéliales des vaisseaux capillaires notamment à partir d'écrasements de prélèvement de cortex (Purchase, 1945). La coloration du frottis est effectuée au Giemsa ou avec des kits de coloration rapide. Les morulas sont encore visibles 48 heures après la mort dans un cerveau maintenu à température ambiante et jusqu'à 30 jours dans un cerveau conservé à +4°C (Camus et Barré, 1988).

L'isolement sur cultures cellulaires à partir de sang d'animaux suspects, peut également être un moyen de diagnostic, utilisable à des fins de caractérisation et d'identification de souches vaccinales, mais non dans le cadre d'un diagnostic de routine.

Le diagnostic sérologique a longtemps fait appel à l'immunofluorescence (Du Plessis, 1981; Jongejan *et al.*, 1989; Martinez *et al.*, 1990). Cette méthode, en plus d'être très lourde pour une utilisation lors de suivis épidémiologiques à large échelle, a montré ses limites en donnant des faux positifs sur des échantillons de sérums provenant d'animaux vivant en zone indemne (Du Plessis *et al.*, 1987). Face aux réactions croisées avec de nombreuses autres espèces d'*Ehrlichia*, Viljoen *et al.*, (1985) ont mis au point le premier test ELISA en utilisant comme antigènes des corps élémentaires d'*E. ruminantium* obtenus de nymphes d'*A. hebraeum* infectées. Afin d'améliorer la quantité et la qualité d'antigènes produits, Jongejan *et al.*, (1991b) ont développé un test ELISA de compétition (cELISA) à partir de cultures de cellules endothéliales bovines infectées par *E. ruminantium*. L'anticorps monoclonal utilisé comme compétiteur est dirigé contre la protéine immunodominante de 32kDa d' *E. ruminantium*, connue sous le nom de MAP1 (Major Antigenic Protein 1). D'autres protocoles d'ELISA indirect ont par la suite été mis au point (Martinez *et al.*, 1993a; Soldan *et al.*, 1993), mais tous sont confrontés, à des degrés différents, à des réactions croisées. Afin d'augmenter la spécificité des tests ELISA, des recombinants de régions immunogènes de la protéine MAP1 ont été utilisés comme antigènes. Dans l'ELISA indirect MAP1-B développé par van

Vliet *et al.*, (1995), la région immunogénique compte 105 acides aminés tandis que l'ELISA de compétition de (Katz *et al.*, 1997) utilise un recombinant plus long de 206 acides aminés. Les deux tests détectent *E. canis* et *E. chaffensis*, mais l'ELISA indirect MAP1-B ne détecte pas *E. bovis* et *E. ovina*. Les résultats satisfaisants obtenus avec ce dernier protocole ont fait qu'il a été largement utilisé par de nombreux laboratoires pour tester expérimentalement ou sur le terrain, des sérums de moutons ou de chèvres ; la spécificité et la sensibilité en ont été jugées bonnes (Mahan *et al.*, 1998c; Peter *et al.*, 2002b). Par contre, sur des sérums de bovins, les résultats ont été moins satisfaisants : l'ELISA MAP 1B détecte les anticorps seulement pendant et peu de temps après une infection expérimentale. Mais sur le terrain, sous l'effet d'infections naturelles, la réponse anticorps semble réduite lors de la première exposition et n'augmente que très peu lors d'infestations répétées par des tiques (Semu *et al.*, 2001), donnant ainsi lieu à une sous-estimation de l'état sérologique des animaux (Mahan *et al.*, 1998c; Peter *et al.*, 2002b). Plus récemment, Sumption *et al.*, (2003) ont mis au point un ELISA de compétition polyclonal (PC-ELISA) dont le choix drastique du seuil de positivité pour les sérums bovins et ovins, permet d'éliminer les réactions croisées avec les autres *Ehrlichia*. Ce test a été utilisé au Ghana pour étudier l'état de séroconversion de bovins, moutons et chèvres sur une période de 34 mois et a permis de montrer que la quasi-totalité des bovins est séropositive – donc exposée à l'infection par *E. ruminantium* mais ne souffre pas de la maladie – tandis qu'une partie significative des moutons et des chèvres qui échappe à cette exposition, ne fait pas de séroconversion et forme ainsi une population sensible (Bell-Sakyi *et al.*, 2004).

Actuellement, le développement de la biologie moléculaire offre des possibilités de diagnostic *ante* et *post-mortem*. Le diagnostic par la réaction d'amplification en chaîne ou PCR supprime toutes les autres méthodes dans les laboratoires mais nécessite une bonne maîtrise. Il peut se faire sur le vecteur ou sur différents organes de l'hôte. Pour cela, deux couples d'amorces AB128 (5'-ACT-AGT-AGA-AAT-TGC-ACA-ATC-TAT-3') et AB129 (5'-TGA-TAA-CTT-GGT-GCG-GGA-AAT-CCT-T-3') ont été dessinés (Mahan *et al.*, 1992) pour amplifier un fragment de la sonde pCS20 dont la spécificité et la sensibilité d'hybridation vis-à-vis de différents isolats d' *E. ruminantium* a été montrée sur des tiques (Waghela *et al.*, 1991). Comparée aux méthodes pré-existantes (immunofluorescence et hybridation), la PCR pCS20 a permis d'améliorer le niveau de détection d' *E. ruminantium* chez le vecteur et chez l'hôte. C'est ainsi que Mahan *et al.*, (1998b) obtiennent des taux d'infection de 92% sur des tiques infectées expérimentalement, 10,5%, 12,5% et 3,2%

respectivement sur des mâles, des femelles et des nymphes d'*A. hebraeum* récoltées dans une zone enzootique. Sur du sang (buffy coat) de chèvres et de bovins, ils obtiennent des taux d'infection respectifs de 23,3% et 3,3-26,7%, les prévalences les plus élevées étant obtenues chez les bovins de plus de 2 ans. Un autre couple d'amorces HH1F (5'-CCC-TAT-GAT-ACA-GAA-GGT-AAC-CTC-GC-3') et HH2R (5'-GAT-AAG-GAG-ATA-ACG-TTT-GTT-TGG-3') amplifiant le gène pSC20 donnerait des résultats meilleurs que le couple AB128/129 (Van Heerden *et al.*, 2004b), mais ce dernier reste en pratique, le plus utilisé. Afin d'améliorer la sensibilité de la PCR pCS20 classique et permettre la détection de très faibles niveaux d'infection, une semi nested-PCR pCS20 (Martinez *et al.*, 2004) a été développée. Celle-ci fut récemment modifiée et utilise les couples d'amorces AB128' (5'-ACT-AGT-AGA-AAT-TGC-ACA-ATC-YAT-3'), AB130', (5'-RCT-DGC-WGC-TTT-YTG-TTC-AGC-TAK-3'), et AB129' (5'-TGA-TAA-CTT-GGW-GCR-RGD-ART-CCT-T-3') (Molia *et al.*, 2008).

Une autre technique biomoléculaire dite RLB (Reverse Line Blot hybridization) a été développée par Bekker *et al.*, (2002). Basée sur l'analyse de l'ADN ribosomal 16S, elle permet la détection simultanée d'espèces d'*Ehrlichia* et *Anaplasma*, mais son utilisation est laborieuse et elle n'offre pas une aussi grande sensibilité que la PCR pCS20.

3.4 L'immunité anti-cowdrienne

Les données sur les bases de l'immunité anti-cowdrienne restent encore fragmentaires, les mécanismes mis en jeu ne sont pas bien élucidés. Cependant, il est admis que l'immunité anti cowdrienne serait à médiation cellulaire (Totte *et al.*, 1997; Totté *et al.*, 1999), les lymphocytes T CD8+ jouant un rôle primordial. A la suite d'une infection, les anticorps produits en réponse de l'hôte, sont détectables aussitôt qu'apparaissent les premiers symptômes fébriles (Viljoen *et al.*, 1987).

3.5 Variation antigénique

Les premières observations faites lors d'essais de protection croisée laissaient penser que la plupart des souches d'*E. ruminantium* protégeaient complètement entre elles et qu'une souche donnée protégeait contre toutes les autres (Uilenberg *et al.*, 1983; van Winkelhoff *et*

Uilenberg, 1981). D'autres essais réalisés plus tard ont montré que ce n'était pas le cas et qu'en réalité il peut même exister une absence totale de protection entre des souches issues de la même région (Du Plessis *et al.*, 1989; Jongejan *et al.*, 1991a). Il a été ainsi constaté que la souche Kümme ne protège pas du tout contre la souche Kwanyanga et que la souche Mara 88/9 ne protège ni contre Ball3 ni contre Welgevonden bien qu'elles aient été toutes isolées en Afrique du Sud. L'éloignement ou la proximité géographique n'influence en rien l'étendue de la protection croisée entre les souches d'*E. ruminantium*. Cette différence de protection croisée met en évidence l'existence d'une variabilité antigénique et d'une diversité génétique. La confirmation de cette hétérogénéité au sein de l'espèce *E. ruminantium* est venue des analyses génétiques des séquences de certains de ses gènes que nous évoqueront plus loin.

4 Contrôle de la maladie

La lutte contre la cowdriose repose sur quatre grandes stratégies : 1) le traitement à base de tétracyclines (celui-ci n'est pas très efficace en pratique puisque le diagnostic est fait souvent dans une phase avancée de la maladie), 2) la lutte contre le vecteur (bien que ce soit la seule manière d'empêcher la transmission de la maladie, son efficacité est limitée par le développement de la résistance des tiques aux acaricides, le coût relativement élevé des produits disponibles), 3) l'établissement d'un état de stabilité enzootique en mettant à profit la résistance naturelle de jeunes animaux et des races autochtones dans des régions d'enzootie et 4) l'immunisation (Uilenberg, 1990; van Amstel et Oberem, 1987).

4.1 Le traitement

Le traitement des animaux malades est possible mais doit être entrepris le plus tôt possible. En effet, il devient inefficace lorsque les signes nerveux et cardiaques s'installent, ce qui survient souvent sur le terrain car l'évolution de la maladie est brutale et la température n'est pas systématiquement contrôlée. Les tétracyclines constituent les molécules de choix dans le traitement de la cowdriose. Des formulations longue-action à la dose unique de 20mg/kg donnent de très bons résultats (Guèye et Vassiliades, 1985). Toutefois, le traitement prophylactique ne peut remplacer une bonne prophylaxie, notamment celle effectuée par le biais de la vaccination.

4.2 *La lutte contre les tiques*

Elle est extrêmement difficile à mettre en œuvre pour de multiples raisons. En effet, les traitements acaricides ne garantissent pas l'éradication des tiques car les différents stades sont également parasites de la faune sauvage et des oiseaux dont il est difficile de contrôler le déplacement. Dans les régions où des traitements systématiques et drastiques sont appliqués en vue de l'éradication de la tique, l'élimination complète de la tique romprait la stabilité enzootique et rendrait les animaux sensibles aux maladies transmises par les tiques. Toute ré-invasion constitue donc un risque majeur. Ce fut le cas au Zimbabwe lorsque, pour des raisons de guerre, les traitements acaricides financés et rendus obligatoires par les gouvernements, avaient été interrompus après des années de lutte drastique (Lawrence *et al.*, 1980). Le cheptel redevenu sensible, connut alors de fortes mortalités dues à l'effet direct des tiques et aux maladies qu'elles transmettent. De plus, le coût des acaricides reste relativement élevé et tout traitement répété et soutenu peut favoriser la sélection de souches de tiques résistantes. Pour toutes ces raisons, l'utilisation des traitements acaricides comme méthode de contrôle des tiques et des maladies qu'elles transmettent n'est pas la panacée.

4.3 *L'équilibre naturel ou stabilité enzootique*

L'état de stabilité enzootique, quand il existe pour une maladie transmise par les tiques, se traduit par une relation stable entre l'hôte, l'agent pathogène, le vecteur et l'environnement : tous devraient coexister tels que la morbidité et la mortalité soient minimales au sein de la population hôte (Norval *et al.*, 1992b). Cet équilibre requiert : (1) une prévalence naturelle suffisante ou élevée du pathogène chez le vecteur; (2) l'existence d'une population d'hôtes réservoirs du pathogène; et (3) la possibilité que l'hôte s'infecte pour la première fois, au moment il présente une certaine résistance naturelle à la maladie.

Dans les pays de l'Afrique de l'Ouest particulièrement, la pratique la plus courante consiste à appliquer un traitement acaricide uniquement lorsque le taux d'infestation par les tiques provoque une gêne pour les animaux ou risque de provoquer des dommages préjudiciables à l'animal (lésions des mamelles par exemple). Entre deux traitements, une infestation modérée permet à l'animal d'être régulièrement réinfecté ce qui relance l'immunité. Lorsqu'aucun traitement n'est entrepris ou lorsque les traitements limitent l'infestation (et les

pertes conséquentes) sans réduire fortement l'infection, il s'établit cet équilibre naturel qui limite l'impact de la maladie (Deem *et al.*, 1996).

Chez les bovins en zone d'enzootie, les veaux sont infestés par les tiques, adultes ou nymphes, très tôt après la naissance, parfois dès la première semaine et en tout cas avant 3 à 9 mois (Soldan *et al.*, 1993) ou même à 5 mois d'âge (Stachurski, 2000b) au moment où ils possèdent encore leur immunité innée et maternelle. La ré-infestation au cours d'une même année relance alors l'immunité, qui persiste au moins 2 ans, et maintient ainsi stable l'enzootie.

Chez les petits ruminants par contre, notamment les moutons, la stabilité enzootique ne peut s'installer car le niveau d'infestation en saison des pluies par les tiques adultes est faible et l'immunité d'origine maternelle disparaît rapidement avant le pic d'infestation par les nymphes en saison sèche. Les agneaux nés au cours du premier semestre sont donc redevenus sensibles à la cowdriose à cette période. Ainsi, en matière de cowdriose, la lutte contre les tiques doit viser à réduire l'infestation à un niveau tel que les pertes dues à leur action vulnérante directe soit minimisée, et l'état de stabilité enzootique, réalisable. Lorsque cet équilibre est difficile à atteindre, soit parce que la prévalence d'infection chez la tique est faible, soit parce que le niveau d'infestation des animaux est faible, ce qui est le cas chez les moutons, il est impératif de conférer aux animaux que l'on désire introduire en zone d'enzootie, une protection artificielle, d'où l'intérêt de la mise au point d'un vaccin.

4.4 Prophylaxie vaccinale

On sait depuis longtemps que les animaux qui survivent à un épisode de cowdriose, acquièrent l'immunité vis-à-vis de la maladie. C'est sur cette base que de nombreuses tentatives de production de vaccin ont été faites (Oberem et Bezuidenhout, 1987). Les premiers essais ont été réalisés avant 1926 et ont porté sur l'inoculation de la bile, l'utilisation de sérum hyper-immun, l'atténuation de l'agent pathogène, l'inoculation de doses sub-létales ou l'inactivation du pathogène avec de la formoline (Alexander, 1931). Mais toutes ces tentatives ont échoué : le pathogène, soit gardait son entière virulence, soit perdait de son immunogénécité car trop inactivé. De nos jours, quatre stratégies vaccinales différentes contre la cowdriose sont développées ou en cours de développement ; la méthode par « infection-

traitement » utilisant du sang infecté par une souche virulente, le vaccin atténué, le vaccin inactivé et les vaccins à ADN recombinant.

4.4.1 L'immunisation par « infection-traitement »

Les observations sur le terrain et les expériences au laboratoire ont prouvé que les bovins, les moutons et les chèvres sont capables de développer une immunité protectrice contre la coudriose quand ils survivent d'une infection virulente. En Afrique du Sud, ce constat a conduit au développement d'une méthode d'immunisation par «infection-traitement» où les animaux reçoivent en injection intraveineuse une souche pleinement virulente et sont traités plus tard avec des tétracyclines pour empêcher le développement de la maladie (Du Plessis et Bezuidenhout, 1979; Du Plessis et Malan, 1987). En dépit du faible niveau de protection croisée de la souche vaccinale (Ball3) utilisée contre les souches de terrain et le fait que c'est une méthode coûteuse et dangereuse, ce procédé reste le seul commercialisé depuis plus de 50 ans (Du Plessis *et al.*, 1990). Une forme alternative de ce vaccin vivant, moins coûteuse et plus concentrée en corps élémentaires, consiste en une suspension de broyat de tiques d'*Amblyomma hebraeum* infectées (Bezuidenhout et Spickett, 1985). Mais cette méthode est souvent responsable de choc chez les jeunes moutons et chèvres, ce qui explique qu'elle n'a pas été largement vulgarisée (Van Der, 1987).

4.4.2 Le vaccin vivant atténué

Au début des années 90, Jongejan, (1991) réussit à atténuer une souche d'*E. ruminantium* du Sénégal (souche Senegal) après plusieurs passages sur des cultures de cellules endothéliales et à préparer un vaccin vivant. Cette souche atténuée put conférer une immunité après une épreuve homologe mais ne fut pas efficace contre d'autres souches virulentes (Jongejan *et al.*, 1993). Une autre souche isolée en Guadeloupe (souche Gardel) a pu être également atténuée après plus de 200 passages sur cultures cellulaires. Zwegarth *et al.* ont par la suite atténué avec succès la souche virulente d'*E. ruminantium* Welgevonden, par passage continu sur une lignée de cellules canines de macrophages (Zwegarth et Josemans, 2001). Après plus de 50 passages, la souche atténuée ne produisit pas la maladie chez des

souris, des moutons ou des chèvres et les animaux étaient immunisés contre une épreuve homologue virulente (Collins *et al.*, 2003; Zweygarth *et al.*, 2005).

L'utilisation de cette méthode est néanmoins limitée puisque la protection croisée contre différents isolats n'est pas complète. L'incorporation dans un vaccin de différentes souches atténuées afin de couvrir le répertoire antigénique complet des populations d'*E. ruminantium* nécessiterait l'atténuation de plusieurs souches minutieusement choisies. Une telle tâche s'avère délicate car toutes les souches ne sont pas atténuables par passage *in vitro* (Jongejan, 1991).

4.4.3 Le vaccin inactivé

Pour résoudre les problèmes liés aux vaccins vivants, Martinez *et al.* (1994) ont développé un vaccin inactivé à partir d'*E. ruminantium* cultivés sur des cellules endothéliales bovines, inactivés et adjuvés au Montanide ISA 50. L'utilisation de ce vaccin induit une protection chez les moutons, les chèvres et les bovins contre des souches homologues et hétérologues, inoculées en intraveineuse ou provenant d'infection naturelle par les tiques de terrain (Mahan *et al.*, 1998a; Martinez *et al.*, 1994; Martinez *et al.*, 1996).

Bien que ce vaccin puisse protéger des animaux contre la mort, il n'empêche pas l'infection. Toutefois, il présente certains avantages puisque (i) il peut être modifié pour inclure n'importe quel isolat d'*E. ruminantium* (pour surmonter le manque de protection croisée entre les souches hétérologues), (ii) les conditions de stockage (possible à -20°C) sont plus compatibles avec une utilisation sur le terrain que les vaccins vivants (qui exigent une conservation dans de l'azote liquide) et (iii) la réduction de la dose vaccinale permet d'augmenter le nombre de doses et par conséquent de réduire considérablement le coût du vaccin (Vachiéry *et al.*, 2006).

Dans ces épreuves vaccinales, les animaux sont immunisés avec deux injections en sous-cutané de 2 ml contenant pour moitié 250-1000 μg d'antigène émulsionné avec de l'adjuvant Montanide ISA 50. Récemment, il a été montré chez des chèvres que cette dose

vaccinale peut être réduite à 35 µg d'antigène sans diminuer l'effet protecteur (Vachiéry *et al.*, 2006). Ce qui réduit ainsi le coût du vaccin, le rendant éventuellement accessible dans les pays africains où les éleveurs ont de faibles moyens. Un défi important demeure la caractérisation de l'étendue de la diversité des souches d'*E. ruminantium* dans les régions enzootiques afin d'assurer un choix approprié des souches vaccinales. Ce pré-requis est valable pour tous les vaccins de nouvelle génération.

4.4.4 Le vaccin à ADN recombinant

Les avantages des vaccins recombinants vis-à-vis des autres vaccins conventionnels sont essentiellement liés à leur innocuité et à leur prix réduit. De plus, de par leur nature, ils permettraient une meilleure présentation de l'antigène aux cellules de l'immunité et procureraient une protection durable. Pour développer des tels vaccins, il est nécessaire d'identifier les antigènes d'*E. ruminantium* qui induiraient une immuno-réaction protectrice. Jusqu'ici, peu d'antigènes recombinants ont été identifiés et caractérisés. Les plus étudiées sont les protéines membranaires de surface, immunodominantes MAP1 et MAP2 (Major Antigenic Protein 1 et 2) (Mahan *et al.*, 1994; van Vliet *et al.*, 1994) qui sont reconnues par des antisérums et les lymphocytes T des animaux infectés et peuvent donc jouer un rôle important dans l'induction de l'immunité cellulaire (Mahan *et al.*, 1994; Totté *et al.*, 1998; Van Kleef *et al.*, 2000). C'est ainsi qu'un vaccin ADN basé sur le gène *map1* a été testé sur des souris (DBA/2) ; la protection obtenue était de 23% à 88% (Nyika *et al.*, 1998). Cette protection fut améliorée en challenge homologue (Souche Crystal Spring), lorsque les souris recevaient en plus du vaccin, un rappel vaccinal avec la protéine recombinante MAP1. Mais en challenge hétérologue (souche Mbizi), la protection était plus faible (Nyika *et al.*, 2002). Des clones de cinq gènes (MAP2, 18HW, 3GD, 1HW, and 4HW) ayant une homologie de séquence de 98% entre Highway, Gardel et Welgevonden ont par la suite été testés individuellement puis en combinaison avec un rappel vaccinal avec la protéine homologue. Malgré la preuve d'une stimulation du système immunitaire à la suite des différents procédés de vaccination, la protection chez les souris n'a guère dépassé 35% (Simbi *et al.*, 2006). Cette stratégie vaccinale reste encore à l'étape du modèle sur la souris, il n'y a jamais eu de preuves de protection chez les ruminants. En revanche, un autre gène polymorphe *cpg1* de la souche Welgevonden a été testé chez la souris et les moutons : il n'y eut pas de protection chez les

souris tandis que 4 des 5 moutons vaccinés survécurent (Louw *et al.*, 2002). Collins *et al.* ont identifié, sur un fragment d'ADN (connu sous le nom de 1H12) de la souche Welgevonden, quatre phases ouvertes de lecture (ORFs) (Erum2540, Erum2550, Erum2580 et Erum259011), qui induiraient une protection partielle chez les souris et 100% de protection chez les moutons en challenge homologue (Collins *et al.*, 2003). La même équipe de chercheurs a travaillé sur l'amélioration de ce vaccin : d'abord en produisant des recombinants r1H12, puis en testant différentes combinaisons de cocktails vaccinaux de ces recombinants et enfin en ajoutant dans le protocole vaccinal, un rappel vaccinal (Pretorius *et al.*, 2007; Pretorius *et al.*, 2008). Les modifications apportées ont amélioré la protection lorsque les vaccins étaient testés en challenge homologue, mais lorsque les animaux étaient transférés sur le terrain pour subir un challenge naturel par les tiques, la protection n'a pas dépassé 20% chez les moutons vaccinés (Pretorius *et al.*, 2007; Pretorius *et al.*, 2008). En plus des problèmes posés par la variation antigénique des souches, il est difficile d'imaginer, concernant les vaccins à ADN, que l'immunité provoquée par un antigène simple serait aussi bonne que celle induite par le corps élémentaire tout entier, lorsque l'on sait que l'immunité est à médiation cellulaire.

4.5 Caractéristiques génomiques d'*Ehrlichia ruminantium*

Les génomes de trois souches de référence ont été entièrement séquencés (Collins *et al.*, 2005; Frutos *et al.*, 2006). Il s'agit de la souche Welgevonden (Erwo) isolée en Afrique du Sud (Du Plessis, 1985), d'un isolat de cette souche maintenu dans un environnement de culture différent en Guadeloupe, la souche Welgevonden Erwe et de la souche Gardel (Erga) isolée en Guadeloupe (Uilenberg *et al.*, 1985). L'analyse génomique de ces trois souches a montré que le génome d'*E. ruminantium* avait une taille d'environ 1,5 mégabases et plus précisément de 1499891 pb, 1513727 pb et 1516355 pb respectivement pour Erga, Erwe et Erwo. Le contenu en G+C est faible avec une valeur moyenne 27,5%. Ce qui frappe en premier lieu avec le génome d'*E. ruminantium* est le faible pourcentage de séquences codantes qui est de 62% à 63%. Bien que ce fait ne soit pas unique, cette valeur reste néanmoins très faible parmi l'ensemble des génomes bactériens. Le génome d'*E. ruminantium* présente aussi un biais G-C très prononcé d'un brin à l'autre avec l'utilisation d'un jeu de codons différent sur chacun des deux brins, une caractéristique connue que chez *Borrelia burgdorferi*, l'agent de la maladie de Lyme et *Treponema palidum*, l'agent de la syphilis (Frutos *et al.*, 2006).

Un autre aspect particulier du génome d'*E. ruminantium* est le grand nombre de répétitions en tandem (Collins *et al.*, 2005; Frutos *et al.*, 2006; Frutos *et al.*, 2007). A ceci s'ajoute le fait que le nombre de copie est variable de façon active (Collins *et al.*, 2005) et que cela révèle la présence d'un mécanisme actif de plasticité génomique du point de vue de la taille (Frutos *et al.*, 2006; Frutos *et al.*, 2007). Si les séquences répétées sont fréquentes et représentent 8,5% du génome (Frutos *et al.*, 2007), les séquences répétées en tandem sont les plus intrigantes. Deux types de séquences répétées en tandem sont présents. Un premier type de période courte (environ 12 pb) et un type de période beaucoup plus longue allant de 100 à 300 pb et centré sur 150 pb. Ces deux types de séquences répétées en tandem existent chez tous les génomes d'*Ehrlichia* séquencés : *E. ruminantium*, *E. canis* et *E. chaffeensis* mais pas chez le genre voisin *Anaplasma*, chez qui seules les séquences répétées en tandem de période courte sont présentes. La différence de nombre de copies de séquences répétées en tandem explique quasi parfaitement les différences de tailles de génome entre les souches Erga, Erwe et Erwo et ces variations sont corrélées avec les régions d'expansion/contraction du génome. L'analyse comparée des génomes d'*E. ruminantium* avec celui d'*Anaplasma marginale* montre une très grande conservation de la syntenie, c'est à dire une très bonne conservation de l'ordre de gènes, avec comme seule différence des écarts de distance liés à la présence des longues répétitions en tandem, ces séquences étant totalement absentes chez *A. marginale*.

De façon encore plus intrigante, ces séquences répétées en tandem sont des événements uniques. A quelques très rares exceptions près, chaque répétition en tandem est unique dans un génome et correspond à un orthologue unique chez les deux autres souches d'*E. ruminantium* séquencées. Aucun orthologue n'est trouvé chez *E. canis* et *E. chaffeensis*. Il semble donc que le mécanisme générant ces longues répétitions en tandem ne soit présent que chez le genre *Ehrlichia* mais aussi que les séquences en tandem ne soient pas un héritage d'un ancêtre commun aux *Ehrlichia* mais spécifique à *E. ruminantium*. Ces répétitions en tandems pourraient en fait être des « cicatrices » laissées par une activité mutatrice et seraient donc liées à des mécanismes actifs de plasticité génomique (Frutos *et al.*, 2007). En outre, ces longues répétitions en tandem ne sont présentes que sur les régions non codantes, ce qui pourrait s'expliquer par leur élimination par sélection purificatrice dans les séquences codantes. Une dernière caractéristique du génome d'*E. ruminantium* allant dans le sens d'une plasticité génomique est la création de pseudogènes dont certains sont récents (Brayton *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2005; Vachiéry *et al.*, 2008) et la présence de répétitions en tandem dans ces

pseudogènes récents, à la création desquels ces séquences répétées pourraient participer (Frutos *et al.*, 2007).

4.6 *Epidémiologie moléculaire de la cowdriose*

Avant d'aller plus loin, force est de définir ce qu'est l'épidémiologie moléculaire. Le concept a eu de multiples définitions à travers la littérature. Nous pouvons néanmoins retenir qu'il s'agit d'une branche multidisciplinaire, relativement récente qui utilise des marqueurs biologiques d'un microorganisme pour étudier l'épidémiologie de la maladie dont il est responsable. L'analyse de ces marqueurs se fait par l'application d'outils de biologie moléculaire. Prenant avantage de la sensibilité et de la spécificité de ces méthodes moléculaires, elle a alors pour but, de définir de manière plus précise et plus fine que l'ont fait les méthodes classiques, la fréquence et la distribution d'une maladie, d'identifier les facteurs qui influencent l'occurrence et la sévérité de la maladie dans une population et d'aider au développement des moyens de lutte et/ou de prévention de la maladie. Pour ce faire, la biologie moléculaire va être utilisée par exemple, pour un meilleur diagnostic de l'agent pathogène, pour évaluer la dynamique de sa population, sa diversité génétique, établir les relations qui existent entre les différentes souches afin de confirmer ou rejeter l'hypothèse que les isolats étudiés proviennent de la même source ou origine, redéfinir les taxons.

Les techniques conventionnelles utilisées se limitaient à des méthodes phénotypiques comme la culture, l'immuno-enzymologie (tests ELISA) pour l'identification bactérienne ou au sérotypage pour le typage de la diversité. Mais la principale des méthodes phénotypiques qui fut utilisée pendant longtemps comme méthode de référence est l'électrophorèse enzymatique multilocus (MLEE) (Selander *et al.*, 1986). C'est une méthode de typage moléculaire basée sur l'analyse de variants électrophorétiques d'un ensemble d'enzymes isomorphes, codant pour des gènes de ménage dits « housekeeping » chez lesquels les variations n'interviennent que très lentement dans les populations. De telles variations sont donc rares à l'échelle d'un seul allèle, mais la combinaison de plusieurs allèles augmente puissamment le pouvoir de discrimination de la méthode. En pratique, cette méthode a l'avantage de mettre en évidence de très faibles variations de taille et de charge entre les protéines. Elle fut appliquée chez *Escherichia coli* pour en étudier les aspects de clonalité

(Achtman et Pluschke, 1986) ou pour définir les structures phylogénétiques chez *E. coli* et chez *Salmonella typhimurium* (Selander *et al.*, 1987).

Le développement de la PCR et l'accès de plus en plus facile au séquençage ont permis le développement d'une pléthore de méthodes de typage génotypique durant les deux dernières décennies dont nous n'allons pas prétendre faire entièrement état ici. Nous signalons au passage qu'il existe des méthodes qui analysent les polymorphismes des fragments de restriction qui proviennent de la digestion de l'ADN par des enzymes de restriction. C'est le cas de l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) qui utilise des endonucléases à coupures rares, générant ainsi des fragments de macrorestriction de 20 à 600kpb. La PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) va à l'inverse, utiliser des endonucléases à coupures fréquentes. Les profils de restriction sont obtenus après digestion des produits d'amplification de gènes cibles et migration électrophorétique horizontale des fragments obtenus. L'inconvénient majeur de ces méthodes est la non reproductibilité des tests et la difficulté de comparaisons inter-laboratoires (van Belkum *et al.*, 2007). D'autres méthodes de typage génomique sont basées sur l'analyse de séquences d'ADN. Parmi toutes ces techniques, la technique de référence actuelle est le typage génomique multilocus ou MLST (Multilocus Sequence Typing). Elle découle de la MLEE et son principe en est le même à la seule différence que les marqueurs utilisés sont d'ordre génomique (Maiden *et al.*, 1998). La MLST consiste ainsi à considérer les séquences nucléiques internes de 5 à 10 gènes de ménage. Les variations de séquences d'ADN observables sur chacun des gènes de ménage constituent un allèle distinct. Et pour chaque souche, la combinaison des différents allèles définit des séquences types (ST). C'est la définition de ces signatures génétiques (les ST) qui fait de la MLST une méthode puissante de typage de la diversité génétique chez les isolats d'espèces bactériennes.

Choix des gènes pour la MLST

Des différentes études sur les génomes, il ressort que les génomes bactériens sont composés de deux principes parties :

- le noyau (ou core) du génome, composé des gènes présents dans toutes les souches d'une espèce donnée. Les gènes du noyau incluent tous les gènes de ménage codant pour des protéines essentielles du métabolisme ou des gènes impliqués dans la régulation des protéines;

- les gènes accessoires qui ne sont pas présents dans toutes les souches. Les gènes accessoires sont généralement classés en 3 catégories : 1) des gènes codant pour des voies biochimiques supplémentaires ; 2) des gènes associés à des phages ou d'autres éléments mobiles ; 3) des gènes codant des protéines impliquées dans l'interaction avec l'environnement externe (protéines de la membrane ou paroi cellulaire, protéines excrétées à l'extérieur de la cellule). Les gènes accessoires codent généralement des facteurs de colonisation ou de virulence. Il faut noter par ailleurs, que beaucoup de gènes sans fonction connue sont également rencontrés dans la catégorie des gènes accessoires.

Sur la base de la variation des gènes housekeeping de la MLST, les espèces avec un niveau modéré à élevé de diversité peuvent être initialement subdivisées en complexes clonaux (clonal complexes, CC) qui sont des groupes de génotypes apparentés.

Les gènes codant des protéines de surface (membrane cellulaire, paroi) qui sont hyper-variables ne devraient pas être utilisés car ils sont plus sujets à une diversification élevée du fait des recombinaisons homologues, et seront ainsi moins fiables pour une reconstruction phylogénétique. En revanche, ils peuvent être utilisés pour évaluer les variations à l'intérieur d'un CC, obtenu à partir de gènes housekeeping. Ceci permet d'analyser plus en détail la structure interne d'un CC.

Du fait des avantages qu'offre la MLST – dont le principal est la possibilité de mise en ligne des données de séquences des agents pathogènes, accessibles via internet – la phylogénie ou la diversité génétique de nombreux pathogènes ont été étudiées surtout en médecine humaine (Harbottle *et al.*, 2006; McCombie *et al.*, 2006; Niyaz *et al.*, 2006; Reinert *et al.*, 2003).

Dans l'étude de l'épidémiologie de la cowdriose, différentes méthodes ont été utilisées avec pour objectifs principaux d'améliorer le diagnostic et le développement de vaccins en étudiant la diversité antigénique d'*E. ruminantium* et dans l'espoir de trouver une corrélation entre les souches et le niveau de protection croisée. Le sérodiagnostic fut d'abord utilisé, mais cette méthode n'a pas permis d'identifier de vrais sérotypes d'*E. ruminantium* (Martinez *et al.*, 1990). Une analyse RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) sur six souches d'origine géographique différente à savoir Gardel, Senegal, Cameroun, Umpala, Lutale et

Welgevonden montrait un regroupement entre Umpale et Lutale toutes deux de l'Afrique de l'Est mais sans qu'aucune relation entre génotypage et protection croisée ne puisse être établie (Perez *et al.*, 1997).

L'étude du polymorphisme de certains gènes fortement conservés entre les souches d'*E. ruminantium* n'a non plus permis de corrélérer les résultats du typage avec la protection croisée au sein des souches d' *E. ruminantium*. L'ARNr 16S de différents isolats d' *E. ruminantium*, très conservé au sein des Rickettsiales, a été utilisé pour élucider les relations phylogénétiques entre *E. ruminantium* et d'autres Rickettsiales (Allsopp *et al.*, 1996; Dame *et al.*, 1992; van Vliet *et al.*, 1992) et pour reclasser *E. ruminantium* dans la famille des Anaplasmataceae (Dumler *et al.*, 2001).

Plus récemment, une analyse phylogénétique de 12 souches d' *E. ruminantium* d'origine géographique différente (Afrique de l'Ouest, Afrique de l'Est, Afrique Australe et Guadeloupe) a porté sur huit (8) gènes housekeeping (16S, pCS20, *ruc*, *ctaG*, *groEL*, *fstZ*, *sodB*, *nuoB*) (Allsopp et Allsopp, 2007). L'étude montre que deux clades (Sud+Est et Ouest) se distinguent, que Gardel ne fait partie d'aucun clade et est la seule souche à ne pas avoir subi de recombinaison car il possède une séquence unique pour tous les gènes étudiés. Sur toutes les autres souches, les auteurs rapportent, sur la base des alignements de séquences, des événements de recombinaison massive mais sans conforter cela par des analyses statistiques solides sur le polymorphisme observé.

D'autres gènes, à l'inverse polymorphes, ont également fait l'objet d'analyses dans l'optique aussi de développer des outils soit pour le diagnostic soit pour le génotypage d' *E. ruminantium*. Le plus étudié d'entre eux est le gène *map1* qui code pour la protéine de surface immunodominante connue sous le nom de MAP1 (Major Antigenic Protein 1) et qui est utilisée dans les tests de diagnostic sérologique (Martinez *et al.*, 1993b; Soldan *et al.*, 1993; van Vliet *et al.*, 1995). *map1* appartient en fait à une famille multigénique de 16 paralogues rangés en tandem sur une région de 25kb du génome d'*E. ruminantium*. Ces gènes paralogues sont tous transcrits *in vitro* sur des cultures de cellules (Bekker *et al.*, 2005; van Heerden *et al.*, 2004a) mais seuls *map1* et *map1-1* sont transcrits *in vivo* chez des tiques, indiquant que cette famille multigénique peut être impliquée dans des fonctions d'importance biologique dans différentes étapes du cycle d'*E. ruminantium* (Postigo *et al.*, 2007). Pour toutes ces

raisons, nombreux sont les auteurs qui focalisent l'attention sur la famille multigénique *map* et sur le *map1* en particulier.

Une analyse PCR-RFLP sur des souches de terrain du Burkina Faso a révélé au moins cinq profils *map1* différents (Martinez *et al.*, 2004) entre lesquels il est impossible de prédire la protection croisée. La même technique a été utilisée en Gambie où 11 profils *map1* ont été identifiés (Faburay *et al.*, 2007c). Toutefois, il est impossible de comparer les résultats de ces deux études car les mêmes enzymes de restriction n'ont pas été utilisés. En tous les cas, le principal résultat commun est l'absence de corrélation entre le génotypage et la protection croisée.

A l'échelle des séquences d'acides aminés, 6 protéines MAP (MAP1, MAP1-2, MAP1-6, MAP1-5, MAP1+1 et MAP1-14) ont fait l'objet d'analyses phylogénétiques (Raliniaina *et al.*, 2009). Il en ressort de plus que le gène *map1* ne permet pas de faire une corrélation entre les génotypes MAP et l'origine géographique (Raliniaina *et al.*, 2009). La grande variabilité de la famille multigénique *map* et de *map1* en particulier, fait qu'ils ne sont pas pertinents pour des analyses phylogénétiques et phylogéographiques. En effet, nous avons vu déjà plus haut, que les gènes hyper-variables ne siéent pas à ce genre d'analyse.

On peut conclure que malgré les nombreuses études conduites pour appréhender la diversité génétique d'*E. ruminantium* et son impact sur la protection, force est de constater que le besoin de marqueurs appropriés reste d'actualité. Or, c'est la caractérisation fine des souches d'*E. ruminantium* circulant en zone d'enzootie qui aidera certainement dans la mise au point de vaccin efficace contre la cowdriose.

5 Bref aperçu sur l'Elevage Burkinabè

Le Burkina Faso est un pays sahélien, plat de 275.000 km² situé entre le 10^{ième} et le 15^{ième} parallèles nord. Le climat des différentes régions du pays est déterminé par la pluviométrie annuelle mais aussi par la longueur de la saison des pluies qui dure entre 4 à 5 mois. Depuis trois décennies, on constate inexorablement une diminution des précipitations avec des saisons paradoxalement ponctuée par des épisodes d'inondations ces cinq dernières années, et une descente des isohyètes vers le sud. Les isohyètes 1400 et 1300 mm/an ont complètement disparues de la carte du Burkina. La zone sahélienne au nord occupe 25% du territoire national avec souvent

moins de deux mois de saison pluvieuse une pluviométrie allant de 150 à 500 mm/an. Le secteur rural occupe une place prépondérante dans l'économie ; 86% de la population totale, soit 12,6 millions d'habitants en 2004, vit en milieu rural. L'élevage constitue la deuxième ressource du secteur primaire burkinabé, représentant 27,2% de sa valeur ajoutée : il s'agit d'un élevage extensif et traditionnel avec un cheptel estimé en 2005 à 7,6 millions de têtes de bovins, 17,7 millions d'ovins et caprins (MRA, 2003). Les races exploitées sont classées en deux principaux groupes :

- les races sahéliennes : elles sont de grandes tailles avec des cornes développées. On les rencontre au nord comme dans le reste du pays à cause du phénomène migratoire. De par leur potentiel génétique plus important, elles sont recherchées mais sont plus sensibles aux maladies ;
- les races dites de zone humide ou subhumide présentent, elles, un gabarit réduit. Elles sont plus tolérantes aux différentes maladies.

L'exemple de la préférence des races sahéliennes par les éleveurs est illustré par les transferts fréquents des moutons de race Bali-bali du nord vers le sud lors des fêtes de Tabaski. Malheureusement, ce mouton résiste difficilement aux conditions climatiques du sud du pays et est très sensible à la coudriose (**Photos 3 et 4**).



Photo 6 : Bélier sahélien de race Bali-bali, (cliché M. Sangaré, 2008)



Photo 7 : Bélier de race Djallonké, (cliché M. Sangaré, 2008)

6 Tiques et coudriose au Burkina Faso

Contrairement à *A. variegatum*, dont la biologie a fait l'objet de nombreux travaux (Stachurski, 2000a; Stachurski, 2000b; Stachurski, 2006; Stachurski et Lancelot, 2006), les données qui existent sur l'abondance et la dynamique d'infestation des autres espèces de tiques et sur les maladies qu'elles transmettent au bétail du Burkina Faso sont fragmentaires depuis les travaux de Ouedraogo *et al* (1975). En 1998, Kaboré *et al.* publient une étude conduite dans la région centre du pays et relèvent l'existence de deux espèces : *Amblyomma variegatum* et *Hyalomma marginatum rufipes*. Un suivi récent, mais très ponctuel, réalisé dans des élevages laitiers de la zone périurbaine de Bobo-Dioulasso rapporte la présence des espèces suivantes : *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, *Rhipicephalus (Boophilus) geigyi*, *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, *Hyalomma marginatum rufipes*, *Hyalomma truncatum* et *Amblyomma variegatum* (Grindatto *et al.*, 2008). L'analyse de l'ADN d'un échantillon de ces tiques par le test de détection simultanée RLB (Reverse Line Blot), met en évidence la présence de *Theileria mutans* et *T. velifera* chez des tiques *Boophilus* et *A. variegatum*. *Anaplasma marginale* a été trouvée sur une tique *B. geigyi*. La faible spécificité du test utilisé ainsi que la nature ponctuelle de cette étude ne permettent pas d'accorder un très grand crédit aux résultats obtenus. Le test détecterait simultanément *Theileria/Babesia* et *Ehrlichia/Anaplasma*. La détection de 2 espèces de *Theileria* et aucune de *Babesia* laissent en effet, planer des doutes sur la spécificité du test. Quant aux maladies dont sont responsables ces pathogènes, notamment les babésioses et les anaplasmoses, elles sont simplement non diagnostiquées chez les animaux car il est admis (à tort certainement) qu'il existe une stabilité enzootique pour ces maladies. Toutefois, la récente introduction de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Côte d'Ivoire et au Bénin constitue une réelle menace pour l'épidémiologie des babésioses et des anaplasmoses dans toute l'Afrique de l'Ouest (Madder *et al.*, 2007). En effet, les échanges transfrontaliers d'animaux sur pied pourraient être le premier moyen d'invasion de la sous région. A ce jour, la source d'introduction de *B. microplus* dans ces deux pays n'est pas clairement définie et son niveau d'expansion n'est non plus connu.

Au Burkina Faso, la coudriose a été identifiée pour la première fois en 1984, sur des bovins de race laitière, importés d'Europe. Mais comme partout ailleurs, les difficultés pour le diagnostic font que la maladie n'est pas suffisamment répertoriée parmi les contraintes majeures de l'élevage, en tête desquelles se trouvent les trypanosomoses animales.

La seule espèce de tique vectrice répertoriée au Burkina Faso est *A. variegatum*. Celle-ci est rencontrée dans toute la zone qui va de la frontière de la Côte d'Ivoire au sud à la latitude de Ouahigouya au nord, et jusqu'à Fada N'Gourma à l'est. En revanche, elle n'a pas été observée à Dori; son extension est probablement limitée au Nord par une ligne isohyète voisine de 500 mm (CIRDES, 1998). Toutefois, cette limite peut changer d'une année à l'autre en fonction de la pluviométrie.

L'importance de la maladie est sous évaluée du fait qu'elle n'est pas systématiquement diagnostiquée sur le terrain. Toutefois, on constate que les tentatives fréquentes de transfert de moutons sahéliens (de race Bali-Bali) du nord du pays où la tique vectrice *A. variegatum* n'est pas présente, vers le sud du pays, où la cowdriose est enzootique, en vue d'augmenter le format des ovins Djallonké par croisement, se traduisent régulièrement par une forte mortalité des moutons introduits. Aussi, en octobre 1995, 40 des 240 ovins sahéliens (17%) introduits par le CIRDES à des fins expérimentales, sont-ils morts de cowdriose avant qu'il ne soit possible de limiter les pertes par des mesures de traitement systématique des animaux à l'Oxytétracycline. Par ailleurs, les animaux vivants au sud en zone d'enzootie subissent aussi les frais de la maladie : de fortes mortalités imputables à la cowdriose, pouvant aller jusqu'à 30 ou 40% chez des agneaux de race autochtone Djallonké, sont régulièrement signalées par les éleveurs ou les vétérinaires. Ces mortalités sont essentiellement observées en début de saison sèche, au moment du pic d'infestation des animaux par les nymphes d'*A. variegatum* et témoignent d'une absence de stabilité enzootique vis-à-vis de la cowdriose chez les petits ruminants. Il n'est alors pas surprenant que toute tentative d'augmentation de la production, soit bovine (en viande et surtout en lait) par croisement des bovins locaux avec des animaux exotiques, soit ovine par croisement des moutons sahéliens bali-bali – très recherchés lors des fêtes de Tabaski – et des Djallonkés pour améliorer le gabarit de ces derniers, se traduise par des fortes pertes chez les animaux introduits dans des zones d'enzootie, s'ils ne sont pas protégés de façon efficace contre la cowdriose.

CHAPITRE 1

Essais vaccinaux et problèmes de protection croisée : Impact de la diversité génétique d'*E. ruminantium* sur l'efficacité de vaccins inactivés

Contexte de l'étude

La présence de la cowdriose sous une forme enzootique en Afrique subsaharienne est la cause majeure de fortes pertes économiques et plus encore un frein très important pour le développement. En empêchant l'importation de races plus productives, cette maladie condamne les éleveurs de l'Afrique au sud du Sahara à une production de faible valeur ajoutée. Par ailleurs, la présence de la cowdriose aux Antilles fait peser une lourde menace pour l'élevage sur le continent américain où, l'élevage est une composante économique majeure. L'élevage sur le continent américain étant associé à des races élites très productives mais en retour très sensibles à la cowdriose, il y a là un risque très important à gérer.

La façon théoriquement la plus efficace de contrôler cette maladie serait de développer une stratégie vaccinale pour protéger les troupeaux. Le problème est que les divers vaccins développés jusqu'à présent se sont tous révélés très limités du point de vue de leur efficacité sur le terrain. Quel que soit le type de vaccin, cette situation d'efficacité limitée s'est systématiquement répétée. Ce problème a toujours été interprété comme la conséquence d'une importante diversité génétique chez *E. ruminantium* sans que toutefois cette diversité ne soit caractérisée de façon rigoureuse et surtout en relation avec un niveau de protection croisée.

Les diverses études qui ont conduit à cette conclusion sur l'efficacité limitée des vaccins sur le terrain ont certes été rigoureuses mais réalisées dans des régions différentes, avec des souches vaccinales différentes, des stratégies différentes et des souches naturelles

bien entendu différentes aussi. Il est dans ce contexte, très difficile de retirer des tendances et encore plus difficile d'établir des corrélations.

1 Objectif de l'étude

Du fait des difficultés présentées ci-dessus, il faut, parallèlement aux recherches en épidémiologie moléculaire, réaliser des essais vaccinaux et évaluer les niveaux de protection croisée dans une même région. Ces essais ont par conséquent été mis en place dans la même zone géographique que celle sélectionnée pour l'étude d'épidémiologie moléculaire et de diversité génétique d'*E. ruminantium* que nous aborderons plus loin dans ce document.

L'objectif est d'évaluer à l'intérieur de la zone d'étude la réalité de la situation vaccinale et notamment de vérifier avec des souches vaccinales de référence si la limitation d'efficacité des vaccins sur le terrain est de nouveau observée et confirmée. Au préalable, il s'est agi d'évaluer, lors d'essais de protection croisée vis-à-vis des souches du Burkina Faso, le potentiel vaccinal de deux souches de référence que sont Gardel, originaire de Guadeloupe (Uilenberg *et al.*, 1985), et Welgevonden, isolée en Afrique du Sud (Du Plessis, 1985). A l'issue de cette évaluation, la souche la plus protectrice devait être testée sur le terrain dans la zone d'étude. Un des objectifs ultimes de cette étude est de déterminer si la variabilité en termes de protection croisée est liée à des souches circulantes différentes et si des niveaux différents de protection/sensibilité pouvaient être associés à ces diverses souches ; puis en cas de protection partielle et différentielle selon les souches de challenge, de disposer de données phénotypiques et de niveaux de protection/sensibilité à associer aux géotypes identifiés dans cette même région.

2 Délimitation de la zone géographique

La zone géographique délimitée pour cet ensemble d'analyses, et en premier lieu les essais vaccinaux, se situe en zone d'enzootie de cowdriose sur trois localités : les villages de Bekuy (3.91° W, 11.60° N), Sara (3.83° W, 11.71° N) et Lamba (4.05° W, 11.66° N). Ces villages se situent à 70 km au nord est de Bobo-Dioulasso dans l'ouest du Burkina Faso. La végétation dans cette région est composée de savanes arborées et arbustives avec, par

endroits, des zones de forêt. Le climat de la région est caractérisé par deux saisons très distinctes. Une saison humide qui dure de mi-mai à début octobre et une saison sèche qui s'étend de novembre à avril. Les précipitations dans cette région ont été en moyenne de 880 mm sur les cinq dernières années. Une quatrième zone d'essai vaccinal a été identifiée en la station expérimentale du CIRDES située à Banankéladaga à 20 km au nord de Bobo-Dioulasso et également en zone d'enzootie.

3 Essais de protection croisée : Identification des souches de challenge

Dans l'optique de respecter au mieux les conditions réelles au sein de la région géographique délimitée de Békuy, des souches naturelles en circulation ont été isolées à partir de tiques sauvages récoltées dans la zone et cultivées pour servir de challenge contre les souches vaccinales sélectionnées. Sept souches ont donc été isolées et cultivées à partir de collectes réalisées dans la zone. Il s'agit des souches Bankouma 421, Bekuy 242, Bekuy 255, Lamba 479, Lamba 465, Sara 292 et Sara 445.

4 Stratégie vaccinale

Les animaux sahéliens utilisés pour ces essais sont de race Bali-Bali et proviennent de la région de Dori au nord du pays, où la tique *A. variegatum* n'existe pas, donc où la maladie ne sévit pas à l'état enzootique. Ces animaux sont réputés très sensibles à la maladie car n'ayant jamais été en contact avec le vecteur et le pathogène. Cet état d'« animal indemne et naïf » a été testé sur tous les animaux d'essais par le test sérologique ELISA MAP1B.

Les essais de protection croisée ont été mis en place à l'étable du CIRDES avec comme souches vaccinales les souches Gardel et Welgevonden. Ces deux souches sont celles dont les génomes ont été entièrement séquencés et qui ont fait l'objet d'une étude génomique comparée (Collins et al., 2005; Frutos et al., 2006). Ces deux souches sont également les souches de référence pour les analyses de diversité génétique et d'épidémiologie moléculaire présentées plus loin dans la thèse.



Photo 8 : Troupeau de moutons suivis lors des essais vaccinaux dans le village de Sara



Photo 9 : Séance de vaccination sur le terrain, ici dans le village de Lamba

Les vaccins testés sur le terrain dans cette étude sont des vaccins inactivés produits à partir de la souche Gardel durant la première année, puis de Gardel + Bekuy 242 durant la seconde. Comme indiquée plus haut, la souche Bekuy 242 a été isolée à partir de tiques et cultivée sur culture cellulaire au CIRDES puis envoyée aux collègues de l'IBET pour la production du vaccin de la deuxième année, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le vaccin Gardel seul. Le choix de vaccins inactivés pour cette étude a été dicté par le fait que dans les conditions réelles d'utilisation c'est ce type de vaccin qui est le plus pertinent. Il n'y a pas de risque de réversibilité ni de pathogénie, contrairement aux vaccins atténués, mais surtout ne s'agissant pas d'un vaccin vivant, la logistique est beaucoup moins importante et onéreuse que pour les vaccins atténués vivants. En particulier, la nécessité d'une chaîne du froid lourde à gérer, coûteuse, ne se fait pas sentir dans ce cas de figure. Dans les conditions climatiques et situations de terrain du Burkina Faso, seuls les vaccins inactivés qui demandent un stockage à -20°C ou une simple réfrigération peuvent facilement être déployés. Par ailleurs, l'utilisation de bactéries tuées permet d'associer diverses souches si nécessaire. C'est donc pour ces diverses raisons que ce type de vaccin a été utilisé pour les essais vaccinaux présentés dans ce travail de thèse.

La caractérisation génétique des souches en circulation réalisée par PCR-RFLP *map1* devait permettre de rechercher d'éventuelles corrélations entre les groupes génotypiques et le niveau de protection croisée.

Les travaux réalisés dans cette partie initiale de la thèse ont été rassemblés dans un article actuellement soumis à *Vaccine*. Cet article est présenté ci après.

Efficiency of inactivated vaccines against heartwater in Burkina Faso: impact of *Ehrlichia* *ruminantium* genetic diversity

Hassane ADAKAL¹, Frédéric STACHURSKI^{1,2}, Maurice KONKOB¹, Sébastien
ZOUNGRANA¹, Damien MEYER³, Valérie PINARELLO³, Rosalie APRELON³, Thierry
LEFRANCOIS³, Isabel MARCELINO⁴, Paula M. ALVES⁴, Dominique MARTINEZ^{2,3},
Nathalie VACHIÉRY³

1. CIRDES (Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone Sub-humide), 01 BP 454
Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso
2. UMR 15 CIRAD-INRA « Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes », TA 30/G, Campus
international de Baillarguet 34398 Montpellier Cedex 5-France.
3. UMR 15 CIRAD-INRA « Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes », Site de Duclos, Prise
d'Eau 97170, Petit Bourg, Guadeloupe.
4. IBET (Instituto de Biologia Experimental e Tecnologica), Oeiras, Portugal.

Abstract

In order to choose the appropriate strains to use in vaccination trial in Burkina Faso, the protective effect of Gardel and Welgevonden strains was measured against Burkina Faso strains in controlled conditions: Gardel strain showed better protection than Welgevonden strain with a survival rate of 59% for Gardel immunised animals (13% for control group) and 45% for Welgevonden immunised animals (25% for control group). The efficiency of the inactivated vaccine, produced under industrial process and stirred tank conditions and emulsified with ISA 50 was then measured on sensitive sahelian sheep. Year 1 vaccine used the Gardel strain whereas Gardel and a local strain were used for Year 2 vaccine. Both were evaluated in field conditions in four villages of Burkina Faso. There was a protective effect of the Year 1 vaccine with 65% of survival rate for vaccinated group compared to 49% for control group (N=153, P=0.053). In Lamba village, there was 50% of survival rate for vaccinated animals compared to 14% survival for control group (N= 30, P=0.04) and in Banankeledaga there was 89% of survival for vaccinated sheep compared to 63% for control sheep; N= 65, P=0.03).

During the second trial, there was an increase of the protective effect compared to first trial: 72% for vaccinated animals vs 47% for naïve animals (N=173, P<0.001). In Bekuy village, 11% of control group survived whereas 61% survived in vaccinated group and in Banankeledaga the survival rate was 69% for control group and 88% for vaccinated group. In this study, we showed that Gardel inactivated vaccine gave promising protective results during field challenge which are improved when local strain is added. *map1* genotyping of strains detected in brains from dead sheep showed that there was a differential distribution of genotypes depending on time and on study areas which could explain the difference of efficiency of the vaccine. Genetic characterization studies of field *ER* strains are required to adapt the choice of the strains to be included in regional vaccines.

1- Introduction

Heartwater is a tick-borne rickettsial disease of wild and domestic ruminants caused by *Ehrlichia ruminantium* (ER) and transmitted by *Amblyomma* tick species. It is prevalent in Sub-Saharan Africa, in many islands of the Indian Ocean (Madagascar, Réunion, Mauritius, the Comoros) and in some Caribbean islands (Antigua and Guadeloupe and Marie Galante). The presence of heartwater in the West Indies constitutes a threat for North and South America where ruminants are susceptible and where potential vectors are present [1]. In Africa, heartwater has an important economic impact, decreasing livestock production and causing high mortality in susceptible herds [2].

Various but unsatisfactory means are available to protect susceptible animals in endemic areas. The control of the tick vectors is very expensive and usually inadequate or insufficient to prevent transmission. Vaccination methods include infection and treatment, attenuated, DNA and inactivated vaccines [3]. The only commercially available method, used in South Africa since decades, is the infection and treatment method which consists in inoculating intravenously virulent Ball 3 ER (blood of an infected animal or tick homogenate) and subsequently treating with tetracyclines. This method is risky (possible transmission of other pathogens and possible loss of animals), expensive (cold chain required for storage, close monitoring of animals during 2-3 weeks) and inadequate in low-input farming systems. Attenuated vaccine of the Senegal strain displayed adequate protection against homologous challenge but poor protection against heterologous strains or field challenge [4, 5]. The possible reversion of the attenuated strain is the main limitation for the use of such vaccines. Moreover, as for any live vaccine, drastic cold chain storage is necessary.

Inactive vaccines have various advantages: they contain inoffensive ER killed organisms and their storage conditions are compatible with field use (-20°C or refrigerated). The inactivated vaccine using killed ER emulsified in oil adjuvant (ISA 50) was tested in experimental and field conditions [6-8]. It conferred good protection against homologous and

some heterologous strains. The protective dose of *ER* inactivated vaccine was recently markedly reduced from 1mg to 35µg of antigen [9]. On the other hand, the optimisation of *ER* vaccine production in stirred tanks and identification of purification process, optimal buffer and storage conditions were successfully done, demonstrating the feasibility of the industrial production of the vaccine [10, 11]. The results from both studies induced a drastic reduction of the cost of the vaccine making it usable especially in developing countries in Africa.

One main question that remains to be answered is whether inactivated vaccine produced using an industrial process is efficient in field conditions. In particular, the impact of the *ER* genetic diversity on the efficiency of the vaccine has to be determined. For that purpose, two successive field trials using inactivated vaccine were implemented in Burkina Faso; first with the Gardel strain and second with an additional local strain. Simultaneously, genotyping of *ER* strains present in both vaccinated and control dead animals, was done.

2- Material and methods

2.1. Animals

Sahelian sheep purchased in the *A. variegatum*- and heartwater-free Dori area, in the North of Burkina Faso, were used for isolation of strains, cross protection experiments and field vaccination trials. They were treated with vermifuge and vaccinated against *peste des petits ruminants* and pasteurellosis. All animals were tested using indirect MAP1-B ELISA before any experiment [12]. Only sero-negative sheep were included in the experiments. Cross protection experiments and strain isolations were implemented in CIRDES facilities, located in Bobo-Dioulasso town.

2.2. Isolation of local stocks

The isolation of Burkina Faso *ER* strains was achieved as follows. Engorged nymphs collected in the study area during the beginning of the dry season were kept for moulting in

controlled conditions at CIRDES. After moulting, adult ticks (10 males and, 5 days later, 10 females) were placed to feed on susceptible Sahelian sheep. At hyperthermia onset, blood was collected and incubated on bovine aorta endothelial cell layers until the appearance of lysis as previously described [13]. Fresh blood from these sheep was also either immediately injected intravenously to animals for challenge or supplemented with 10% DMSO before snap freezing in liquid nitrogen for further use.

The strains isolated in Burkina Faso, Lamba 465, Sara 292, Bekuy 242, Bankouma 421, Sara 445 and Lamba 479, were used to evaluate the protective effect of Gardel. Lamba 465, Bankouma 421 and Sara 445 were used for heterologous challenges on Welgevonden (a strain isolated in South Africa) vaccinated sheep. The strains from Burkina Faso were recently *map-1* genotyped by sequencing of *map-1* PCR products [14]. All are Senegal *map-1* genotype except Lamba 479 which is 97% identical to Kiswani *map-1* genotype.

2.3. Cross protection experiments in controlled conditions: evaluation of the heterologous protective effect of Gardel and Welgevonden strains

Infective material was prepared from 2 Sahelian sheeps inoculated with infected cell culture supernatants either from Welgevonden or from Gardel strains (both supplied by CIRAD). Infected blood collected at hyperthermia was frozen in 10% DMSO and stored in liquid nitrogen. It was then thawed and injected intravenously to sheep when needed: 11 animals were infected with the Welgevonden strain and 12 with the Gardel strain. One or 2 days after the hyperthermia onset, animals were treated with long acting oxytetracycline. Heterologous challenges were carried out 4-9 weeks later using fresh or stored infective blood from animals experimentally infected with local strains, as described above. Four control animals (naïve for *ER*) were simultaneously infected with each of these local strains.

2.4. Antigen preparation and vaccine formulation

Vaccine doses were produced by IBET in stirred conditions as previously described [10]. The vaccine used during the first field trial contained only Gardel strain, whereas equal proportion of Gardel and Bekuy 242 strains were present in the vaccine used for the second trial. Each dose contained 375 µg of *ER* vaccine assessed using BCA technique (Bicinchoninic acid, Pierce, Brebières, France) according to the manufacturer's instructions. The inactivated vaccine was stored (-20°C) until use and mixed 1/1 with Montanide ISA 50 in the field before subcutaneous injection [15]. PBS emulsified with ISA 50 was used to inoculate control animals.

2.5. Field Vaccination trials

2.5.1- Vaccination of Sahelian sheep

Sahelian sheep were vaccinated with the inactivated vaccine and boosted 4-5 weeks later. Table I summarizes the data regarding the number of sheep involved in the two trials. Two weeks after boosting, the vaccinated animals were dispatched to the Banankeledaga research station (20 km North of CIRDES) and in three villages, in flocks of local Djallonke sheep: Bekuy (3.91° W, 11.60° N), Sara (3.83° W, 11.71° N) and Lamba (4.05° W, 11.66° N). Vaccinated animals arrived 2-3 weeks after the onset of *A. variegatum* nymph infestation period in the study areas, and 1-3 weeks before the infestation peak. The studies were carried out during the beginning of the dry season because it was previously noticed (unpublished observations) that sheep infestation by adult ticks during the rainy season is very low, preventing the vast majority of the animals to contract the disease at that period.

2.5.2- Monitoring of sheep during vaccination trials

On the station as well as in the village flocks, when clinical signs appeared (reluctance to move or difficulty to stand up), rectal temperature of the sick animal was checked. Brains of the dead sheep were collected and either used to prepare brain smears or stored at -20°C or in

ethanol for further molecular analysis of the *ER* strains.

2.5.3- Tick counts

Amblyomma variegatum infestation was determined once a week (interval between 2 counts: 6-8 days) by counting all ticks attached to animals randomly chosen in the different flocks. During both field trials, 20 animals were examined at Banankeledaga station. In other areas, 6-12 sheep (Year 1) and 4-8 sheep (Year 2) were examined in the village flocks according to flock size. The surveys were terminated when the infestation level had become very low. The total number of infesting nymphs was assessed taking into account the mean engorgement period of *A. variegatum* nymphs (6.25 days, as determined during other studies) and the interval between 2 successive tick counts.

2.5.4- Antibody response to vaccination and field challenge

During the first trial, sera were collected from all sheep before the primo-vaccination, one month after this injection and two weeks after the boost, when the animals were brought from the heartwater-free area. After 2 months of field challenge, sera were collected from surviving animals. During the second trial, sera were collected before the primo-injection and two weeks after the boost.

Detection of MAP-1 antibodies was done on serum samples using MAP-1B indirect ELISA [12].

2.5.5- Diagnostic of heartwater and *Ehrlichia ruminantium* strain typing

The diagnostic of heartwater was done both by GIEMSA staining of brain crushed smears [16] and by *pCS20* nested PCR on brain samples [17]. DNA was extracted from brain using the Qiamap DNA extraction kit following the manufacturer's instructions (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany). The nested *pCS20* PCR was used as previously described [17]. Briefly,

AB128 (5'-ACTAGTAGAAATTGCACAATCTAT-3') and AB130 (5'-ACTAGCAGCTTTCTGTTTCAGCTAG-3') primers were used on 200ng/μl of total DNA for first PCR at annealing temperature of 50°C, then AB128 and AB129 (5'-TGATAACTTGGTGCGGGAAATCCTT-3') primers were used for second PCR at 55°C on 1μl of the first PCR product. All samples were also tested for *map-1* nested PCR as previously described [14]. Digestion of PCR products using restriction enzymes such as TaqI, RsaI, MspI allowed the characterization of *map-1* genotypes [17]. Some of the *map-1* PCR products were sequenced and compared with *map-1* sequences from known isolates. For some samples, we detected two or three strains. Thus, the percentage of one *map1* genotype was calculated considering the number of this genotype compared to the total number of *map1* genotypes.

2.6. Statistical analysis

Survival rates between groups were compared by means of the Chi square test. Difference was significant when *P* values ≤0.05.

3- Results

3.1. Protective effect of Gardel and Welgevonden strains against experimental challenge with Burkina Faso strains

Following the heterologous challenge with Burkina Faso strains belonging to the Senegal *map-1* genotype, the survival rate was 45% (4/11) in the Welgevonden immunised group whereas 25% (3/12) of the control animals survived (*p* = 0.30) (Table II). There was no significant difference in incubation period and intensity of fever between control and vaccinated groups (data not shown). Welgevonden strain conferred a different level of protection against each heterologous strain (between 25 to 67% of survival).

Results of protective effect of Gardel strain against heterologous challenges are presented in Table III. The survival rate was significantly higher in the vaccinated animals

(59%, 17/29) than in the control group (13%, 3/24), ($P < 0.001$). Depending on the strain used for challenge, the percentage of survival varied from 100% to 20% for immunised group whereas 0 to 25% of the control animals survived (Table III). Gardel strain conferred the best protection against Sara 445, Bankouma 421 and Lamba 479 strains with more than 67% of survival. The percentage of protection varied strongly within the *map-1* genotype cluster Senegal.

3.2 - Field vaccination trials

3.2.1 - Protective effect of the inactivated vaccine during field challenge

On the total number of animals during the field trials, seventy-two of the 153 sheep died during the first field trial, and 71 of the 173 animals during the second one. *ER* colonies were observed in the brain smears of 54 (75%) and 55 (77%) of these animals, for the two studies respectively, attesting that they died of heartwater. Seventy out of 72 brain samples were analysed by PCR during the first year. Sixty eight out of 70 sheep (97%) were positive for *pCS20* target region and 67 (96%) for *map1* gene. During the second field trial, all the brains were tested and were positive with both PCR tests. Altogether, we were able to confirm that at least 140 out of the 144 dead animals died from heartwater

From one year to another, the percentage of survival in the control group was globally similar: 49% vs 47% ($P = 0.83$). However differences were observed between villages and in Bekuy a significant 5-fold decrease of the survival rate was observed between the two successive years (55 to 11%, $P = 0.01$).

During year 1, the survival rate was 65% (42/65) for vaccinated animals whereas 49% (43/88) of the control animals survived ($N = 153$, $P = 0.053$). The protective effect of the vaccine was significant in Lamba (50% of survival rate for vaccinated animals compared to 14% survival for control group; $N = 30$, $P = 0.04$) and in Banankeledaga (89% of survival for vaccinated sheep compared to 63% for control sheep; $N = 65$, $P = 0.03$) (Figure 1).

During year 2, the protective effect of the vaccine containing both Gardel and Bekuy 242 strains was significant with an increase of the overall survival rate of the vaccinated sheep (72%) in comparison with the control animals (47% ; N=173, $P < 0.001$). There was a significant protective effect of the vaccine in Bekuy (N=36, $P < 0.01$) and in Banankeledaga (N=88, $P < 0.05$) with a marked increase of survival reduction of the mortality in vaccinated groups compared to control groups (Figure 1). In the two other villages, Lamba and Sara, the survival rate differed between control and vaccinated groups from 42 to 58% ($P=0.41$) and from 33 to 50% ($P=0.16$).

Tick infestation and MAP-1 seroconversion

Sahelian sheep were infested by *A. variegatum* nymphs as soon as they were placed in the different flocks. During year 1, the infestation peak was observed during the first (in Sara and Lamba) or the second (in Bekuy and Banankeledaga) tick count. During year 2, the infestation peak was observed 1-3 weeks later compared to first year (Figure 2). In year 1, the average sheep infestation peaked between 8 and 20 ticks, according to the flock; it reached 26-62 nymphs/animal during the second field trial. After two months, the infestation steadily decreased and at the end of the trial, each sheep was infested with less than 2 nymphs.

On average, each animal was infested by 84 (± 38) nymphs during the monitoring period of the first field trial, and by 237 (± 115) nymphs during the second study. The infestation varied dramatically according to the flock and to the animal. For the Banankeledaga flock for example, the nymph burden varied from 3 to 32 ticks among sheep examined at the infestation peak of the first trial, and from 7 to 83 ticks at the infestation peak of the second one.

During the first field trial, the average antibody level (percentage of a positive control) of the vaccinated sheep increased from 4% ($\pm 1\%$) before the primo-injection, to 63% ($\pm 6\%$) before the boost, and to 89% ($\pm 5\%$) 2 weeks later. Only 2 out of the 65 animals from

vaccinated group were still sero-negative after the first vaccine injection but they sero-converted two weeks after the boost. The antibody level varied after boosting from 26% to 134% depending on animals. Before the field challenge, the control sheep were sero-negative ($4\% \pm 1\%$). Seven weeks after the beginning of the field challenge, 85% of the surviving control sheep (12/16 in the villages; 11/11 in Banankeledaga) had sero-converted.

During the second field trial, the average antibody level of the vaccinated group increased from 2% ($\pm 1\%$) before the primo-injection to 51% ($\pm 3\%$) two weeks after the boost. The control group was sero-negative before vaccination ($0\% \pm 0\%$) and before field challenge ($3\% \pm 1\%$).

Distribution and typing of *ER* strains during vaccination field trials

The *ER* strains present both in control and vaccinated groups during the two field challenges were identified by *map-1* genotypes on brain samples. Percentages of *ER* genotypes in each group are shown in figure 3 and 4. There were 3 main *map-1* genotypes, Kiswani, Senegal and Mali, and 3 minor genotypes, Antigua, Burkina Faso and Gardel. Other strains, corresponding to 2 unknown *map-1* genotypes and KBD, were included in the category “other genotype”. The two unknown strains and KBD *map-1* genotypes (originated from Senegal) were described in a previous study [14]: the unknown strains correspond to Lamba 350 and Bekuy 070 strains in the *map-1* genetic tree. During the first year, depending on the areas, there was a predominance in the control group of Kiswani (in Banankeledaga), Senegal (in Lamba), both Gardel and Senegal (in Bekuy) and Mali *map-1* genotypes (in Sara). Apart in Bekuy village, the percentage of Gardel *map-1* genotype on the total *map-1* genotypes detected was very low (0 to 13%) and this *map-1* genotype was not detected during year 2 either in vaccinated or in control group. Globally, there was a significant difference of the percentage of Senegal *map-1* genotype in the control group from one year to another ($N=122$, $p=0.005$) from 31 to 56%. In year 2, 44 to 63% of *map-1* genotype belonged to Senegal

depending on the villages.

During year 1, Antigua *map-1* genotype was not detected in vaccinated animal group whereas it represented 13% of *map-1* genotypes in control group. This effect of Gardel vaccination on the Antigua distribution was significant (N=91, P=0.05). There was no effect of Gardel vaccine on Senegal and Mali genotypes distribution during the first year. However, in year 2, a significant diminution of the distribution of *map-1* Senegal genotype was observed between control and vaccinated animals from 56% to 29% (N=94, p=0.015). In Banankeledaga, there was no Senegal genotype detected in vaccinated group whereas 44% of *map-1* genotype was the Senegal type in control samples. In Bekuy, only 25% of *map-1* genotype was Senegal for vaccinated group compared to 63% for control group.

4- Discussion

In this study, we first analysed the comparative protective effect of Gardel and Welgevonden strains against Burkina Faso local strains in order to choose the appropriate vaccinal strain for the first year field trial. We observed a difference of protective effect between strains due to antigenic diversity which has been demonstrated previously in other studies for strains such as Gardel, Senegal, Welgevonden, Mbizi and Kerr Seringe independently of the nature of the vaccine [5, 7, 18]. We showed that Gardel had a better protective effect than Welgevonden strain against Burkina Faso strains: 59% of survival for Gardel vaccinated group compared to 45% for Welgevonden with an intensity of the challenge stronger for Gardel than for Welgevonden (13% vs 25% survival rate for control groups). Thus, Gardel strain was more appropriate for field trials in Burkina Faso and was chosen as a master strain. Conversely, the lack of protection of Gardel inactivated vaccine against the Kerr Seringe strain from Gambia has been described previously [18]: there was 43% of survival for Gardel vaccinated group after challenge with Kerr sering strain. On the other hand, Welgevonden had been demonstrated to be a good candidate for attenuated

vaccine as it protected against several strains from South Africa (Ball3, Blauwkraans, Mara 87/7) [19]. These results highlighted the variability of cross protection and the importance of choosing the appropriate vaccinal strains for a specific area.

The mortality rate in control animals varied from one year to another and depending on the areas. Even though the infestation was higher during the second field trial, it was not correlated with the mortality due to heartwater. In Banankeledaga, the mortality of the control group was similar during the two years whereas the mean number of ticks doubled from year 1 to year 2. In the other areas, the cumulated number of ticks was three-fold higher whereas the survival rate increased in Lamba and decreased in Bekuy and Sara. The MAP-1 sero-conversion of 85% of the tested control animals observed after 7 weeks of natural tick challenge during the first study, demonstrated that the majority of the surviving sheep had already been infected by *ER* at that moment, while 67-90% of the nymph infestation had already occurred depending on the flock. Three of the 4 sero-negative animals were observed in the flocks where the cumulated infestation was 25-33 nymphs. In the flocks where the infestation had reached 40 nymphs at that moment, all but one animal had sero-converted or were already dead of heartwater. Since the infestation during the second year was 2 to 3-fold higher, it is assumed that all sheep were infected during the study, unless the percentage of tick infection by *ER* dramatically decreased during the second field trial. The strategy chosen (bringing the animals to the field just before the peak of nymph infestation) was proven to be appropriate to allow *ER* infection of nearly all the animals.

The approximate 50% mortality rate observed in control animals during both studies is therefore not due to lack of infection of part of the flocks. It may be due to variation of virulence amongst the *ER* strains present in the areas, or to variation of the amount of *ER* organisms inoculated by the infected ticks, mimicking in certain cases an infection with a sublethal but immunizing dose, protecting sheep against most of the further infections. A weak field challenge had been described previously during a vaccinal assay using DNA

vaccine in South Africa. However, the level of tick infestation was not evaluated in the previous study [20]. Our study shows for the first time a complete picture of heartwater in the field from tick infestation to the mortality of animals. Therefore, it would be interesting now to address the question of the role of ticks in the dynamics and distribution of *ER* strains.

During the first field challenge, there was a marked increase of the survival rate for vaccinated group compared to control group in Banankeledaga. In Lamba, the increase of survival rate between control and vaccinated groups (14% vs 50%) was similar to results obtained during field challenge using inactivated vaccine in South Africa and in Zimbabwe with a increase of survival from 16% to 52% and from 19% to 58% respectively [7]. In the two other villages, the vaccine only protected slightly probably because of the low cross protective effect of Gardel towards circulating strains.

Map-1 genotypes typed in brains of control sheep were the strains circulating during the vaccination trials whereas those found in vaccinated animals corresponded to breakthrough strains. Surprisingly, the same *map-1* genotypes were found both in control and vaccinated groups. However, even if *map-1* genotypes were similar, this did not mean that the strains were identical [14]. The absence of the Antigua strain in vaccinated surviving animals demonstrated the effect of Gardel vaccine against this Antigua *map-1* genotype. Conversely the Gardel vaccine did not have any effect towards the Senegal and Mali *map-1* genotypes.

During the second field challenge, the addition of Bekuy 242 to the vaccine induced a significant protective effect in Bekuy and Banankeledaga villages. There was also an increase of survival rate due to the vaccine in Lamba and Sara. Globally, there was a significant effect of the addition of Bekuy 242 to the vaccine on the percentage of Senegal *map-1* genotype identified in brains of vaccinated animals. Bekuy 242 protected partly against Senegal *map-1* genotype, found in 73% of the dead control sheep and only 39% of the dead vaccinated animals. Even though there was not a complete protection by the vaccine, there was an improvement of its efficacy by the addition of the local strain: 72% of survival for vaccinated

group and 47% for control group.

New vaccination approaches using DNA vaccines were tested recently [3, 20]. They were efficient against homologous challenge but they did not give satisfactory results during field challenge. For DNA vaccination, the use of gene gun was also necessary to induce a protective effect. An attenuated vaccine with the Welgevonden strain conferred good protection in controlled conditions against homologous and four different strains but was not yet tested in field conditions [19, 21]. Moreover, depending on breeds, the attenuated vaccine showed an unexpectedly high degree of virulence [21]. Another attenuated vaccine with the Senegal strain showed a better efficiency during field challenge (75% of protection) [18]. Compared to our results on the inactivated vaccine protection, the Senegal attenuated vaccine was more efficient during field challenge: the survival rate was similar for vaccinated groups but the challenge was stronger for Senegal attenuated field trial with 100% mortality rate for control group. However, results from Gambia suggested that the main cause of mortality was due to Kerr Seringe strain. Kerr Seringe *map-1* genotype was found in all controlled animals and another strain was typed in the 3 dead vaccinated animals. This suggested that the genetic diversity in the Gambia experimental area is lower than in Burkina Faso villages.

In the context of high genetic and antigenic diversity which had been described in different geographical zones [14, 17, 22-24], the difficulty of vaccine design is to select the appropriate protective strains with the widest protective effect against regional circulating strains. The choice of a group of strains would be an alternative if any reliable genetic marker related to a cluster group of protection is defined. Several approaches of genotyping using multi locus analysis (MLST/MLVA) of strains in relation to cross protection data are tested [25] and would allow identification of protective markers. Furthermore, these markers could be involved in the protective immune response.

In this study, we showed that an inactivated vaccine that has several advantages compared to other vaccines (cost, no cold chain required, no reversion...), gave promising protective

results during field challenge. For the first time, we showed that an inactivated vaccine using an industrial process in stirred tank conditions was efficient in field experiments. We demonstrated that the Gardel strain was more appropriate than Welgevonden strain for its use in Burkina Faso as inactivated vaccine. The addition of a second local *ER* strain to the Gardel strain vaccine improved protection against heartwater in field experiment. Genetic characterization studies of field *ER* strains is required to adapt to the geographical area the choice of the strains to be included in regional vaccines.

References

- [1] Barré N, Uilenberg G, Morel P-C, Camus E. Danger of introducing heartwater onto the American mainland: potential role of indigenous and exotic *Amblyomma* ticks. Onderstepoort Journal of Veterinary Research 1987;54:405-17.
- [2] Provost A, Bezuidenhout JD. The historical background and global importance of heartwater. Onderstepoort J Vet Res 1987 Sep;54(3):165-9.
- [3] Collins NE, Pretorius A, Van Kleef M, Brayton KA, Zweygarth E, Allsopp BA. Development of Improved Vaccines for Heartwater. Ann NY Acad Sci 2003;990:474-84.
- [4] Jongejan F. Protective immunity to heartwater (*Cowdria ruminantium* infection) is acquired after vaccination with *in vitro* attenuated rickettsiae. Infect Immun 1991;59:729-31.
- [5] Jongejan F, Vogel SW, Guèye A, Uilenberg G. Vaccination contre la cowdriose avec des *Cowdria ruminantium* atténuées *in vitro*. Rev Elev Méd Vét Pays trop 1993;46(1-2):223-7.
- [6] Mahan SM, Kumbula D, Burrridge MJ, Barbet AF. The inactivated *Cowdria ruminantium* vaccine for heartwater protects against heterologous strains and against laboratory and field tick challenge. Vaccine 1998;16(11-12):1203-11.
- [7] Mahan SM, Smith GE, Kumbula D, Burrridge MJ, Barbet AF. Reduction in mortality from heartwater in cattle, sheep and goats exposed to field challenge using an inactivated vaccine. Veterinary Parasitology 2001;97:295–308.
- [8] Martinez D, Maillard JC, Coisne S, Sheikboudou C, Bensaid A. Protection of goats against heartwater acquired by immunisation with inactivated elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. Vet Immunol Immunopathol 1994;41:153-63.
- [9] Vachiéry N, Lefrançois T, Esteves I, Molia S, Sheikboudou C, Kandassamy Y, et al. Optimisation of the inactivated vaccine dose against heartwater and *in vitro* quantification of *Ehrlichia ruminantium* challenge material. Vaccine 2006; 24:4747–56.
- [10] Marcelino I, Sousa MFQ, Vérisimo C, Cunha AE, Carrondo MJT, Alves PM. Process development for the mass production of *Ehrlichia ruminantium*. Vaccine 2006;26:1716–25.
- [11] Marcelino I, Vachiéry N, Amaral AI, Roldão A, Lefrançois T, Carrondo MJT, et al. Effect of the purification process and the storage conditions on the efficacy of an inactivated vaccine against heartwater. Vaccine 2007; 25:4903–13.
- [12] van Vliet AHM, Zeijst vD, Camus E, Mahan SM, Martinez D, Jongejan F. Use of a specific immunogenic region of *C. ruminantium* MAP 1 protein in a serological assay. J Clin Microbiol 1995;33:2405-10.

- [13] Smith GE, Anderson EC, Burridge MJ, Peter TF, Mahan SM. Growth of *Cowdria ruminantium* in tissue culture endothelial cell lines from wild African mammals. J Wild Dis 1998;34:297-304.
- [14] Raliniaina M, Meyer DF, Pinarello V, Sheikboudou C, Emboulé L, Kandassamy Y, et al. Mining the genetic diversity of *Ehrlichia ruminantium* using map genes family. Veterinary Parasitology, doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.020 2009.
- [15] Martinez D, Perez JM, Sheikboudou C, Debus A, Bensaid A. Comparative efficacy of Freund's and Montanide ISA50 adjuvants for the immunisation of goats against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. Vet Parasitol 1996;67:175-84.
- [16] Purchase HS. A simple and rapid method for demonstrating *Rickettsia ruminantium* (Cowdry, 1926) in heartwater brains. Vet Rec 1945;57:413-4.
- [17] Martinez D, Vachiery N, Stachurski F, Kandassamy Y, Raliniaina M, Aprelon R, et al. Nested-PCR for detection and genotyping of *Ehrlichia ruminantium* ; use in genetic diversity analysis. Annals of New-York Academy of Sciences 2004; 1026:106-13.
- [18] Faburay B, Geysen D, Ceesay A, Marcelino I, Alves PM, Taoufik A, et al. Immunisation of sheep against heartwater in The Gambia using inactivated and attenuated *Ehrlichia ruminantium* vaccines. Vaccine 2007; 25:7939-47.
- [19] Zweggarth E, Josemans AI, Van Strijp FM, Lopez-Rebollar L, Van Kleef M, Allsopp BA. An attenuated *Ehrlichia ruminantium* (Welgevonden stock) vaccine protects small ruminants against virulent heartwater challenge. Vaccine 2005;23:1695-702.
- [20] Pretorius A, van Kleef M, Collins NE, Tshikudoa N, Louwa E, Faber FE, et al. A heterologous prime/boost immunisation strategy protects against virulent *E. ruminantium* Welgevonden needle challenge but not against tick challenge. Vaccine 2008;26:4363–71.
- [21] Zweggarth E, Josemans AI, Steyn HC. Experimental use of the attenuated *Ehrlichia ruminantium* (Welgevonden) vaccine in Merino sheep and Angora goats Vaccine 2008;26S:G34–G9.
- [22] Adakal H, Bada-Alambedji R, Stachurski F. Etude de la variabilité antigénique d'*Ehrlichia ruminantium* dans la région sud-ouest du Burkina Faso en vue de l'application d'une vaccination. Revue Africaine de Santé et de Productions Animales 2004;2(2):132-7.
- [23] Jongejan F, Thielemans MJC, Briere C, Uilenberg G. Antigenic diversity of *Cowdria ruminantium* isolates determined by cross-immunity. Rev vet Sci 1991;51:24-8.
- [24] Vachiéry N, Jeffery H, R. P, Aprelon R, Pinarello V, Kandassamy Y, et al. *Amblyomma variegatum* ticks and heartwater on three Caribbean Islands Ann NY Acad Sci 2008;1149:191-5.
- [25] Adakal H, Meyer D, Carasco-Lacombe C, Pinarello V, Allègre F, Karine H, et al. MLST scheme of *Ehrlichia ruminantium*: Genomic stasis and recombination in strains from Burkina Faso. Infect Genet Evol 2009;in press.

Table I: Field trials

		Banan- -keledaga	Bekuy	Lamba	Sara
Year 1 of field trial	Number of vaccinated animals	19	11	16	19
	Number of control animals	46	11	14	17
Year 2 of field trial	Number of vaccinated animals	40	18	12	12
	Number of control animals	48	18	12	13

Table II: Protective effect of Welgevonden strain against experimental challenge with Burkina Faso strains

Challenge strain	<i>Map-1</i> genotype	Control group Survival rate N surviving/N total (%)	Vaccinated group Survival rate N surviving/N total (%)
Sara 445	<i>Senegal</i>	1/4 (25%)	2/3 (67%)
Bankouma 421		1/4 (25%)	2/4 (50%)
Lamba 465		1/4 (25%)	1/4 (25%)
Global Mortality		3/12 (25%)	5/11 (45%)

Table III: Protective effect of Gardel strain against experimental challenge with Burkina Faso strains

Challenge strain	<i>Map-1</i> genotype	Control group Survival rate N surviving/N total (%)	Vaccinated group Survival rate N surviving/N total (%)
Sara 292	<i>Senegal</i>	0/4 (0%)	1/5 (20%)
Bekuy 242		0/4 (0%)	3/6 (50%)
Lamba 465		1/4 (25%)	2/4 (50%)
Bankouma 421		1/4 (25%)	3/4 (75%)
Sara 445		1/4 (25%)	4/4 (100%)
Lamba 479	<i>97% Kiswani</i>	0/4 (0%)	4/6 (67%)
Global mortality		3/24 (13%)	17/29 (59%)

Figure 1: Effect of single-strain and double-strains inactivated vaccine on the survival rate of animals in four villages in Burkina Faso

Number above the columns corresponds to the number of animals within control and vaccinated groups for each village

*: significant protective effect of the vaccine ($p < 0.05$)

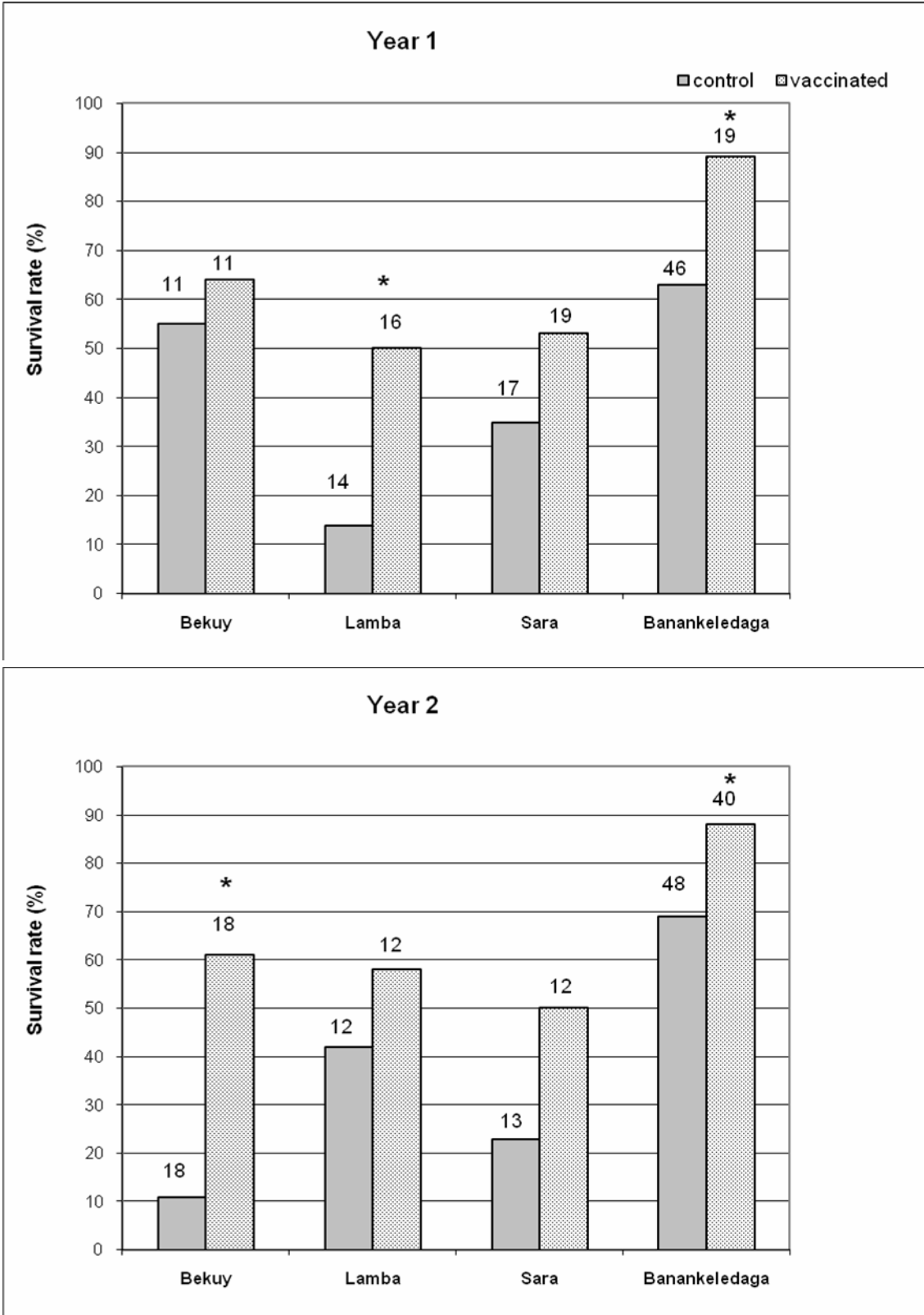


Figure 2: *Amblyomma variegatum* nymph infestation during the two field studies.

You should use the same YY axis.

Use “A” and “B” for each field trial

Does A (Y1 field trial) correspond to vaccination with inactivated ERgardel only (single strain vaccine)?

Does B (Y2 field trial) correspond to vaccination with inactivated ERgardel+ERBekuy (double strain vaccine with local strain)?

Does the XX axis correspond to the tick collection days?

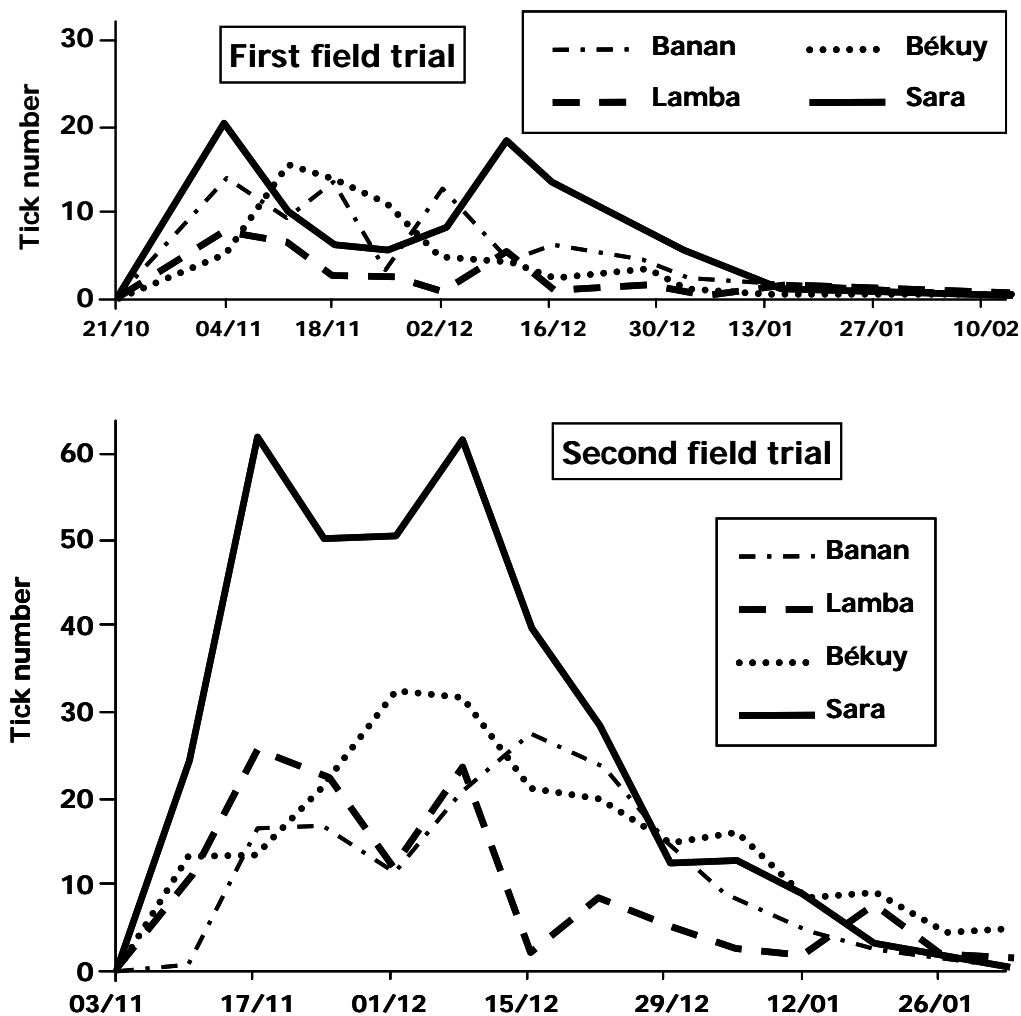


Figure 3: Distribution of *ER map-1* genotypes in brains from control and vaccinated groups during year 1 of vaccination trial

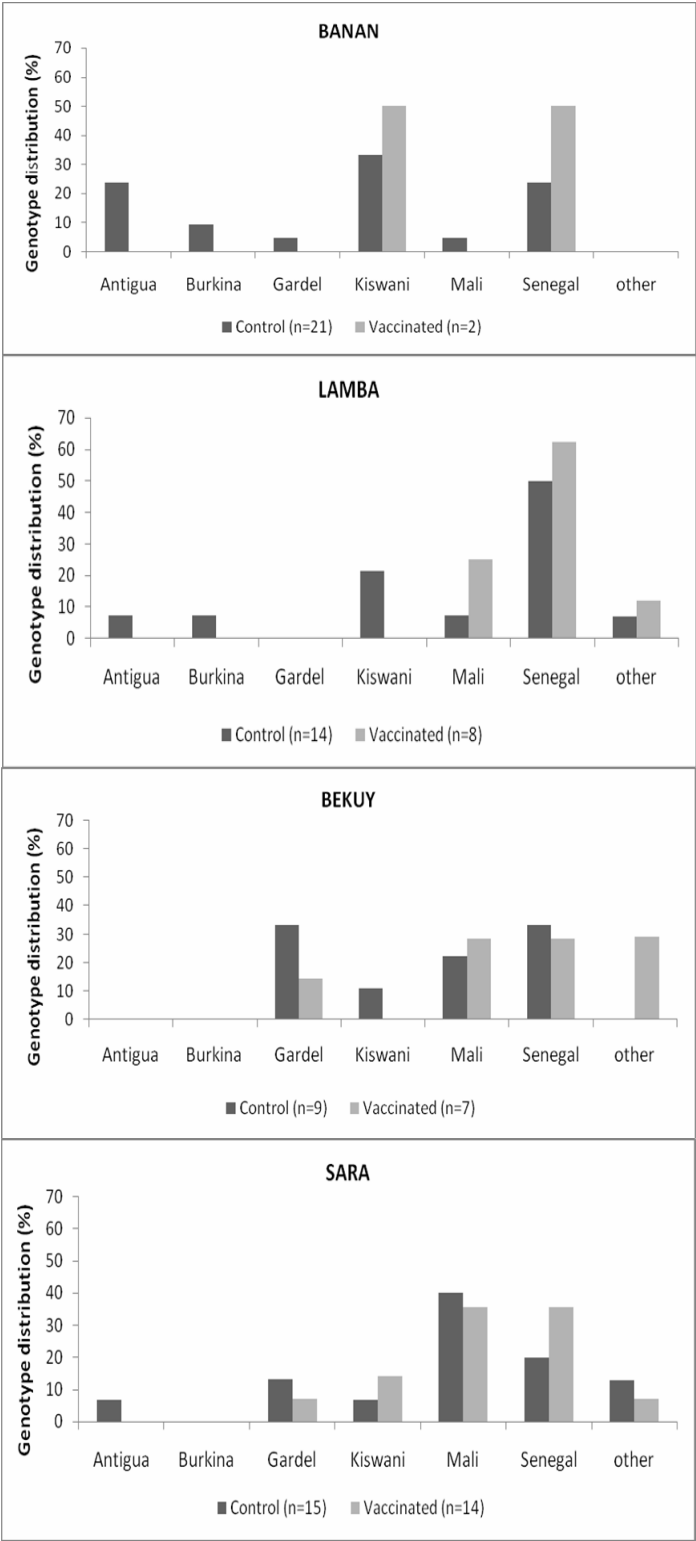
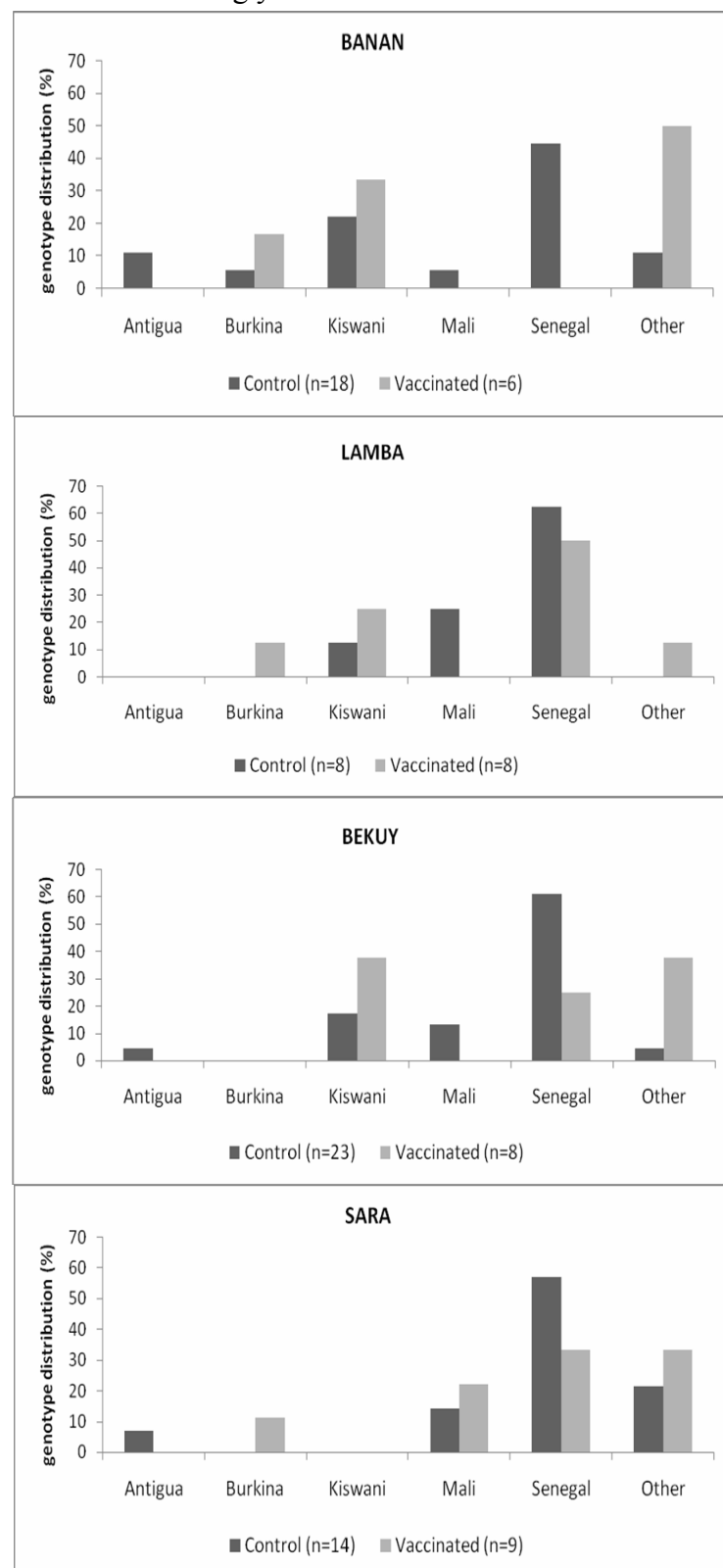


Figure 4: Distribution of *ER map1* genotypes in brains from control and vaccinated groups during year 2 of vaccination trial



5 Conclusions

Les résultats résumés dans cet article montrent que les souches vaccinales Gardel et Welgevonden n'étaient pas capables d'apporter une protection efficace et satisfaisante contre la cowdriose, d'abord en conditions expérimentales puis en conditions réelles sur le terrain, concernant Gardel dans ce dernier cas. La protection apportée contre des souches naturelles par la souche Welgevonden était en moyenne de 45%, c'est à dire une mortalité moyenne de 55% chez les animaux vaccinés. La mortalité moyenne montait à 75% chez les animaux témoins. La souche Gardel a apporté une efficacité un peu supérieure avec une protection moyenne de 57%, à savoir une mortalité moyenne de 43% chez les animaux vaccinés, mortalité qui est montée à 82% chez les témoins. Cette efficacité limitée des souches vaccinales se double d'une variabilité importante selon les souches locales et les souches vaccinales. La souche vaccinale Welgevonden s'est avérée faiblement protectrice quelle que soit la souche locale alors que la souche vaccinale Gardel a montré une plus grande variabilité dans la protection apportée selon la souche locale. Si une protection correcte a été obtenue contre les souches Bankouma 421, Bekuy 255 et Lamba 479 (mortalité de 33% au maximum), une efficacité beaucoup plus limitée a été obtenue contre les souches Lamba 465 et Sara 445 avec une mortalité allant de 50% à 67%. Le plus mauvais résultat a été obtenu contre la souche Sara 292 qui a engendré une mortalité de 80% chez les animaux vaccinés.

Si ces premiers résultats confirment l'efficacité limitée et surtout variable des vaccins face à des souches locales hétérologues, les résultats de tests sur le terrain montrent aussi une variation significative dans la protection en fonction de la localisation, même dans une petite zone comme celle délimitée dans le cadre de ce travail. Ces premières constatations sont confirmées par les résultats obtenus avec la souche vaccinale locale Bekuy 242 qui, lorsqu'elle est additionnée à la souche Gardel, réduit par deux la mortalité au sein de la population vaccinée. Toutefois, si une nette amélioration est apportée par cette souche, elle n'apporte pas une protection complète, indiquant par là que la diversité en termes de protection croisée est plus importante que cela.

Trois conclusions au moins s'imposent. D'abord, l'ajout d'une souche locale à la souche dite de référence, augmente significativement la protection et nous laisse penser que les nouvelles orientations de recherche de vaccins contre la cowdriose doivent être orientées

vers l'exploration des souches locales pour la production de vaccins régionaux voire locaux. Ensuite, ces travaux montrent que, non seulement les vaccins produits avec les souches de référence (que nous appelons ici « vaccins génériques ») ne sont pas véritablement efficaces sur le terrain, mais aussi et surtout que cette efficacité varie fortement de façon non prévisible. Enfin, la méthode de caractérisation des souches par PCR-RFLP *map1* utilisée dans cette étude n'a pas mis en évidence de corrélations entre les géotypes *map1* observés et la protection croisée.

La nécessité première avant tout développement de vaccins est donc de mieux comprendre la dynamique de ces souches et surtout des souches locales et de mieux caractériser les mécanismes en jeu par l'utilisation de méthodes plus fines et plus appropriées. *E. ruminantium* nécessitant un vecteur pour sa propagation, la première étape à envisager, présentée dans la deuxième partie de cette thèse, est l'influence potentielle de la dynamique du vecteur sur la diffusion des souches d'*E. ruminantium* et de la cowdriose et ce, bien entendu, au sein de la même zone d'investigation. Au préalable, nous présentons dans cette partie, les moyens de lutte contre les tiques couramment utilisés par les éleveurs du Burkina Faso (**Chapitre 2**) et d'autres méthodes, plus intégrées et moins dispendieuses dans l'utilisation de produits acaricides (**Chapitre 3**). Toutes ces méthodes doivent concourir à la limitation de la transmission du pathogène à un niveau tel que l'état de stabilité enzootique devienne une réalité sur le terrain.

DEUXIEME PARTIE

Les tiques et les méthodes de contrôle au Burkina Faso

CHAPITRE 2 :

Efficacité des méthodes courantes de lutte contre les tiques au Burkina Faso

1 Contexte d'étude

Environ 80 pour cent du cheptel mondial est menacé d'infestation par les tiques ou de maladies transmises par les tiques. Il y a plus de 10 ans, on estimait que le coût des opérations de lutte et les pertes de productivité étaient de l'ordre de 7 milliards de dollars par an. Les tiques et les maladies qu'elles transmettent sont la principale entrave à une augmentation de la production en Afrique.

Pour limiter l'impact de ces tiques et des maladies qu'elles transmettent, c'est en Afrique de l'Est et en Afrique australe que les moyens les plus drastiques ont été déployés dans les années 1950, avec l'utilisation de bains détiqueurs, rendue obligatoire par les gouvernements, pour protéger les bovins exotiques des colons installés dans ces régions des dégâts causés par les tiques et les maladies qu'elles transmettent. Cela permit l'éradication de la theileriose à *Theileria parva* (East Coast Fever) en Afrique du Sud et au Zimbabwe, mais la pression des traitements acaricides exercée sur les populations du vecteur de la maladie, *Rhipicephalus appendiculatus*, eut pour conséquence, la sélection de tiques résistantes à toute la gamme de produits disponibles, avec les premiers cas de résistance détectés dans des populations du genre *Boophilus* (Baker *et al.*, 1979). Une des conséquences importantes de ces traitements « abusifs » qui nettoyaient entièrement les animaux de leurs tiques, fut la perte de la stabilité enzootique vis-à-vis des autres maladies transmises par les tiques (Norval *et al.*, 1992a) avec le retour à l'état « sensible » d'animaux même de races autochtones (Lawrence *et al.*, 1980). La perte de la stabilité enzootique apparaît en effet, lorsque l'infestation résiduelle

est trop peu importante pour permettre la relance régulière de la protection immunitaire. La FAO recommande du reste, l'établissement de cette stabilité enzootique qui permet de limiter l'impact des maladies transmises par les tiques et est considérée comme la méthode naturelle de lutte contre ces maladies (FAO, 1990).

En Afrique de l'ouest, il n'y a pas eu d'introduction massive d'animaux exotiques pouvant justifier le besoin d'une lutte intensive contre les tiques. Les méthodes de lutte utilisées par les éleveurs sont restées traditionnelles, basées sur le détiqage manuel, mais avec de plus en plus l'utilisation de produits chimiques. Le détiqage manuel est laborieux et présente aussi des risques de blessures pour l'animal lors de la contention mais également pour ceux qui assurent la contention. Quant à l'utilisation des produits chimiques à visée acaricide, elle se fait au moyen de pulvérisateur que l'éleveur porte au dos pour traiter individuellement chaque animal de son troupeau. Dans ce cas aussi, le traitement à l'échelle du troupeau est laborieux. Par ailleurs, le coût des produits disponibles sur le marché n'est souvent pas à la portée de chaque exploitant. Mais même quand ils disposent de moyens suffisants, les éleveurs n'ont pas encore la culture de l'investissement dans la santé de leurs animaux. Aussi, les produits sont-ils dilués de sorte à traiter le maximum d'animaux sans aucun respect de la posologie ou simplement remplacer par des produits à visée phytosanitaire ou à usage domestique ou encore mélangés à la bouse de vache. Sur le terrain, la diversité de produits utilisés et leur mode d'utilisation ne sont pas connus. De plus, la source d'approvisionnement de ces produits, leur qualité et leur utilisation sur le terrain ne sont pas contrôlées.

2 Objectifs de l'étude

Cette situation mérite d'être examinée avec pour objectif de proposer aux services vétérinaires compétents, les outils de contrôle et de régularisation et de gestion des produits acaricides vendus sur le marché. Nous avons pour cela conduit une étude afin d'examiner les méthodes de lutte utilisées sur le terrain par les éleveurs traditionnels pour contrôler l'impact des tiques. Leur perception de l'efficacité de ces méthodes était recueillie au travers d'un questionnaire. Ensuite, la sensibilité des populations de *Boophilus* spp aux principaux acaricides utilisés était testée.

Nous avons délibérément choisi de travailler sur ce genre car il est plus susceptible de développer de la résistance que les autres genres. En effet, les tiques *Boophilus* sont monoxènes c'est-à-dire qu'elles accomplissent leur cycle de développement sur un seul hôte à la fois. Ce cycle débute par l'infestation des animaux par les larves. Sur le même hôte, les adultes et les femelles gorgées en l'occurrence, chutent au bout de 21 jours en moyenne pour pondre et initier un nouveau cycle. De ce fait, on peut observer une succession de 3 à 5 générations par an qui sont toutes soumises aux pressions de sélection exercées par les traitements acaricides. *A. variegatum* par contre est une tique trixène et a besoin de trois hôtes obligatoires différents pour chacune de ses states larve, nymphe et adulte. De plus, elle n'accomplit qu'un seul cycle par an dans les régions tropicales à une saison des pluies par an. La question des pratiques courantes de lutte contre les tiques au Burkina Faso dépassant bien entendu, le seul cadre de la région d'étude identifiée dans ce travail de thèse, l'évaluation a par conséquent été conduite sur l'ensemble du pays.

Les résultats de ce travail sont résumés dans l'article présenté ci-après et qui a été soumis à *Veterinary Parasitology*.

1 Tick control practices in Burkina Faso and acaricide resistance survey in

2 *Rhipicephalus (Boophilus) geygyi*

3 Hassane Adakal ¹, Frédéric Stachurski ^{1,2}, Christine Chevillon ³

4 ¹ *Centre international de recherche-développement sur l'élevage en zone subhumide*
5 *(CIRDES) 01 B.P. 454, Bobo-Dioulasso, BURKINA FASO*

6 ² *CIRAD, UMR15 « Contrôle des maladies » 34398 Montpellier cedex 5 FRANCE*

7 ³ *Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses (UMR CNRS-IRD 2724), Centre IRD*
8 *911 avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5 FRANCE*

9
10 Corresponding author:

11
12 Christine Chevillon

13
14 Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses (UMR CNRS-IRD 2724), Centre IRD,
15 911 avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5 France

16 Phone : 33-467 41 63 10

17 Fax : 33-467 41 62 99

18 E-mail : christine.chevillon@ird.fr

19

Abstract

Tick control practices in Burkina Faso were assessed by interviewing 60 stockbreeders working in traditional husbandry system. Acaricide-based controls mainly used synthetic pyrethroids (SP; alphacypermethrin for N =20 and deltamethrin for N= 18) and marginally Amitraz (N= 6 out of 60). Otherwise farmers either remove ticks by hand (N = 7) or plaster cattle with dung, engine oil and/or crop pesticides (N = 9). Some farmers scheduled treatments every week or fortnight (N = 4 and N = 11 among farmers using alphacypermethrin or deltamethrin, respectively) but treatment decision was more frequently adjusted on a case-by-case basis after visual evaluation of tick-burden (N =38). Fourteen stockbreeders declared failures of acaricide-based controls while using amitraz (N = 1 out of 6), alphacypermethrin (N = 10 out of 18) or deltamethrin (N = 3 out of 20). We evaluated whether such perceived tick control failures referred to actual development of resistance by focusing on the widely used SP chemicals and on a species with short generation-time: *Rhipicephalus (Boophilus) geigy*. Engorged female ticks were collected on the cattle of interviewed farmers, and SP-resistance level of offspring was evaluated using the FAO Larval Packet Test. LC₅₀ and LC₉₀ of field-derived larvae were compared to those computed for the reference laboratory strain, the Houndé strain. No SP-resistance was detected on the bioassays performed on this sentinel species. Meanwhile, LC₅₀ and LC₉₀ relative to alphacypermethrin and deltmethrin were proved to remain stable across 12 successive generations of the Houndé strain. This study provides the first solid data regarding tick control practices and their impact in SP-susceptibility for a sentinel tick species in Burkina Faso.

Keywords: *Rhipicephalus (Boophilus) geigy*; Alphacypermethrin; Deltamethrin; Resistance; Larval Packet Test; Burkina Faso.

Introduction

Ticks are the most important ectoparasites hampering the development of livestock industry in tropical and sub-tropical areas (Jongejan and Uilenberg, 1994). Direct losses in cattle and small ruminants production that are due to ticks are caused by blood-sucking, injection of toxins, wounds and damages to hides and udders. Indirect losses arise through the mortality or morbidity induced by tick-borne diseases (TBD).

In southern and eastern Africa, the most economically important ticks are *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma hebraeum* (Norval, 1983; Rechav, 1982). *R. appendiculatus* vectors *Theileria parva*, the agent of East Coast Fever, a disease that had induced half a million cattle deaths per year in East Africa (Miller and McKelvey, 1977). *A. hebraeum* is vectoring *Ehrlichia* (former *Cowdria*) *ruminantium*, the causative agent of heartwater which causes high mortality especially to small ruminants and exotic breeds. *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* and *R. (Boophilus) decoloratus* are other abundant ticks that may be economically important in susceptible cattle breeds (Baker et al., 1989). These ticks are vectoring various TBDs, such as babesiosis, anaplasmosis, bovine ehrlichiosis. But indigenous breeds lived generally in endemic stability with limited economical impacts of all TBDs (Norval et al., 1984; Norval et al., 1983). Government tick control programs based on huge acaricide usages were implemented in southern and eastern Africa to reduce the economical losses due to ticks and TBDs. The consequence of such programs was the development of acaricide resistances in abundant *Rhipicephalus* (*Boophilus*) species followed by the introduction of more expensive molecules in tick control programs (Baker et al., 1981; Norval et al., 1992).

In West Africa, wherever studies of tick dynamics were carried out, the most abundant species were *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus* (*Boophilus*) species (Farougou et al., 2006; Knopf et al., 2002; Mattioli et al., 1997; Tomassone et al., 2004). *A. variegatum* causes

heartwater to small ruminants and is associated with dermatophilosis in cattle (Plowright, 1956). As enzootic stability is assumed established for heartwater in indigenous cattle breeds (Stachurski and Lancelot, 2006), the economical impact of *A. variegatum* mostly relates to the destruction of cattle teats by adult ticks (Stachurski, 2000). As a result in West Africa, tick control by traditional farmers is focused on *A. variegatum* adults, and hence is carried out exclusively during rainy seasons when such adults are active (Stachurski, 2000). No governmental program was implemented to control cattle ticks so that West African farmers have got the entire cost and decision responsibility of tick control. In countries such as Burkina Faso where most farmers live in low-input livestock systems, acaricide are considered too costly so that farmers use crop pesticides or chemicals of uncertain origins to tick control (Stachurski, 2000). The objectives of the present study are to better evaluate tick control practices in Burkina Faso and to settle solid bases for monitoring their possible impact on tick resistance, as roughly no data is available on this last issue.

Tick control practices in traditional husbandry system were assessed by interviewing 60 farmers distributed across the country. Farmers using chemical-based control were also asked whether they perceived tick control failures. A biological model was required to settle whether tick control failures correspond to acaricide resistance development. We chose to focus on a one-host tick-species with short generation-time because such characteristics will enhance the evolutionary weight of acaricide selection pressures within herds, and hence are likely to speed up the local development of acaricide resistance. *Rhipicephalus (Boophilus) geigyi* was chosen as such a sentinel species. Baselines for acaricide-induced mortality were provided by a reference *R. geigyi* strain maintained in laboratory. These baselines were compared to the acaricide-induced mortalities observed in the offspring of fully engorged female ticks collected in 14 villages visited during the tick control practices survey.

Materials and methods

Tick control measures

From November 2005 to January 2006, a questionnaire was submitted to 60 farmers distributed over 19 localities in order to assess tick control practices in Burkina Faso (Fig. 1). Five questions were asked to farmers. 1- Do they use acaricides to control ticks? 2- In case of acaricide-based control, which products do they use? 3- How are acaricides applied on cattle? 4- What is the average frequency in acaricide-treatment? 5- Do farmers think that tick control has been efficient?

Tick sampling for bioassays

R. geigy ticks were collected in 14 of the 19 villages visited for investigations on tick control practices. Fully engorged females were sampled on the most infested cows encountered in the examined herds. Ticks collected from different cows and from different herds were pooled together in order to form one stock per locality. Sampled females were placed in plastic tubes whose lid, bored of a hole covered with tulle, prevented ticks from escaping. Ticks were brought to the CIRDES laboratory within 2- 5 days following the sampling. In the laboratory, ticks were placed under optimal conditions of temperature ($27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) and relative humidity ($85\% \pm 5\%$) for egg-laying. Females were identified based on counting the number of denticles on hypostome and examination of males whenever available. *R. geigy* was the only species sampled everywhere but in Kaya where all collected ticks were *R. decoloratus*.

Bioassays

Bioassays were performed with the following synthetic pyrethroids as commercial formulations: deltamethrin (Butox®, SOFACO, Group Roussel Uclaf, Paris) and alphacypermethrin (Dominex®, FMC CORPORATION, USA). Concentrations of

commercial products are respectively 50g/l and 100g/l. When the number of larvae obtained was insufficient to test both products, the priority was given to deltamethrin.

The bioassay method was the Larval Packet Test (LPT) developed by (Stone and Haydock, 1962) and subsequently adopted by FAO as a standard (FAO, 2004). Chemicals were diluted in a mix of olive oil and trichloroethylene according to a 2:1 volume ratio. Packets were formed of a 7.5 cm x 8.5 cm piece of Whatman paper. Each piece of paper was impregnated by 0.67 ml of solution (solvent in controls and acaricide solutions otherwise) and was placed two hours in hood for solvent evaporation. Papers were then folded to form packets that receive about 100 tick larvae each. Tick larvae were 14 to 21 days-old when entering LPT. Each control and acaricide dose was represented by duplicates. Packets were then incubated at controlled temperature ($27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) and relative humidity ($85\% \pm 5\%$). Surviving and dead ticks were counted after 24 hours of acaricide exposure.

According to preliminary tests performed on the reference Houndé strain (see below), the highest concentration leading to no mortality was 0.00312 g/l while the lowest leading to 100% mortality was 0.4g/l for both commercial acaricides. Accordingly, LPT were defined by series of eight (8) half-dilution doses distributed in-between these extremes. As active ingredients can be deteriorated in dilution (Moreira et al., 2002), solutions were never conserved more than a month.

Reference strain

During a tick sampling session made on February 2005, about fifty engorged females *R. geigy* were collected in one cattle herd from the district of Houndé. Brought to CIRDES laboratory, fully engorged females were allowed to lay eggs under controlled conditions. Four days later, the first batches of eggs were maintained in incubator to hatch; the resulting larvae

were assessed for alphacypermethrin-induced mortality when they were 9-20 days old and for deltamethrin-induced mortality when they were 8-23-days old.

The remaining F0 ticks were allowed infesting a Zebu x N'dama crossed-breed steer. One generation of *R. geigy* was completed in less than 93 days with an overall incubation period of 27 days corresponding to the time required for females to lay eggs and for eggs to hatch. In order to limit the development of immunity against ticks, the same steer had been infested by no more than three successive tick generations before to be replaced. Cattle infestation was achieved by larvae less than 45-days old. It was thus possible to complete at least 4 tick-generations per year. SP-induced mortality was assessed on successive generations of the Houndé strain. The alphacypermethrin-induced mortality was assessed on generations F0, F1, F5 and F12; the deltamethrin-induced mortality was assessed on generations F0, F1, F2 and F12.

Statistical analysis

Mortality responses were analyzed using Polo-PC (LeOraSoftware, 1987) accordingly to the stepwise procedure described by (Roberston and Preisler, 1992). Abbott correction was not necessary because mortality remains lower than 5% in controls in all tests. Mortalities were probit-transformed, and acaricide doses were transformed into their natural logarithm. Transformed data were adjusted to a linear model in order to estimate LC₅₀ (i.e. concentration resulting in 50% mortality). Deviation from linearity of log-probit transformed data was assessed through a chi-square test (Roberston and Preisler, 1992). Resistance ratios (RRs) and their confidence intervals (95% CI) were computed for each sample relatively to the reference Houndé strain by taking into account the variance and covariance of the slopes and intercepts of both regressions (Roberston and Preisler, 1992). Difference between LC₅₀ estimates was designated as significant if their 95% confidence interval (CI) did not overlap.

Results

Tick control practices and acaricide efficiency as perceived by stockbreeders.

All interviewed farmers affirmed to only control ticks in rainy seasons (data not shown).

Seven out of the 60 interviewed stockbreeders (11%) declared having no tick control program aside manual removal and/or punctual application of oil or dung on cattle: four were located in the dry northern part of the country (two in Ouahigouya and two in Sebba where mean rainfall is more or less 400mm/year, Fig. 1) and three in Fada N’Gourma (Fig. 1). Nine out of the 60 stockbreeders (15%), mostly situated in northern and western parts of the country (Fig. 1), controlled ticks by plastering cattle with insecticides for controlling agricultural pests. Other stockbreeders actually sprayed cattle with more conventional acaricides; alphacypermethrin (N = 20 or 33% of the interviewed farmers), deltamethrin (N = 18 or 30%) and amitraz (N = 6 or 10%).

Alternative chemical-usages were not randomly distributed in the country (Fig. 1). Amitraz usage occurred in throughout the country but with less importance in terms of number of users; the use of deltamethrin mostly concerned the West part of Burkina Faso and that of alphacypermethrin was mostly concentrated in the Central region (Fig. 1). In the four cases of amitraz use, the chemical was sprayed; the treatment schedule was adjusted according to visual evaluation of tick burdens; and stockbreeders judged tick control efficient except in one farm of the Oradora district (Table 1). Answers varied more largely among the cases where tick control was based on either the used of agricultural insecticide, of alphacypermethrin or of deltamethrin (Table 1). Treatment frequency was generally adjusted to the visual evaluation of tick burden and more rarely planed onto an a priori schedule of every one to two weeks. Stockbreeders more frequently reported tick control failures when treating ticks with alphacypermethrin (N = 10 out of 20) than with deltamethrin (N = 3 out of 18; Table 1).

Settling baselines of acaricide-induced mortality through selection for the Houndé strain

Table 2 summarizes the results of dose-mortality responses for alphacypermethrin and deltamethrin along successive generations of the Houndé laboratory-maintained strain. Mortality data were rarely perfectly fit by log-probit linear model (χ^2 -test, $P < 0.05$ in 8 out of 11 assays; Table 2). Relatively to generation F0, no significant difference in susceptibility was detected for either deltamethrin ($0.93 \leq RR_{50} \leq 1.39$ and $0.89 \leq RR_{90} \leq 1.04$) or alphacypermethrin ($0.79 \leq RR_{50} \leq 1.14$ and $0.45 \leq RR_{90} \leq 0.96$).

Susceptibility levels to deltamethrin and alphacypermethrin in field-derived larvae

Tables 3 and 4 summarize the bioassays results obtained on the offspring of field-collected females for deltamethrin and alphacypermethrin, respectively. Mortality data did not perfectly fit with the log-probit model (χ^2 -test, $P < 0.05$ in all cases except for alphacypermethrin-induced mortality in Dano and Manga samples). Repeating LPT on the reference Houndé strain, the reference in acaricide-response were characterized for deltamethrin by $LC_{50} = 0.036$ g/l (95% confidence interval [0.028; 0.047]) and for alphacypermethrin by $LC_{50} = 0.031$ g/l (95% confidence interval [0.029; 0.033]). Relatively to the deltamethrin-baseline, 12 field-derived samples displayed a higher susceptibility ($RR < 1$; Table 2), offspring of the Kaya sample displayed similar mortality response ($RR \approx 1$) but offspring of the Sidéradougou sample displayed a slightly lower mortality ($1 < RR_{50} < 1.6$ and $1 < RR_{99} < 1.5$; Table 2). In alphacypermethrin-bioassays, all field-derived larvae were as susceptible (see in table 3, $RR_{99} \approx 1$ for Ouagadougou) or even more susceptible ($RR_{50} < 1$ and $RR_{99} < 1$) than larvae from Houndé strain.

Discussion

In West African countries, especially in Burkina Faso, most farmers are in low-input livestock systems and fully responsible of any decision and payment relative to tick control measures.

Our study firstly confirmed the perception of an absence of rule regarding acaricide usages in Burkina Faso. Tick control practices vary from hand-removal of ticks to chemical-based controls based on either regular acaricide usage or on deviant use of any agricultural insecticides available. Meanwhile, treatments are rarely scheduled but most farmers adjust treatment to tick-burdens evaluation. Secondly, our study revealed that farmers' perception of tick control failures tends to be more frequently associated to the usage of conventional acaricide use than to usage of agricultural insecticides. This perception can be interpreted as a result of false answers from farmers during the interviews. Indeed, as they know that treatment with agricultural insecticides is considered as misuse and prohibited for tick control, farmers may never report failures regarding these chemicals.

The study displayed that fewer claims have been reported for Amitraz usage. This chemical has the advantage to "clean" animal from ticks within hours after the treatment. This direct and spectacular effect is well appreciated by farmers. In contrary, treatment with SP such as deltamethrin and alphacypermethrin may remain dead ticks on animals over several days before they fell down. Moreover, the fact that more failures are reported against alphacypermethrin than against deltamethrin can be due to that farmers do not follow any treatment scheme when using alphacypermethrin.

It is finally noteworthy that the absence of tick control and deviant use of agricultural insecticides mostly concerned the districts located along the northern borders where *Amblyomma variegatum* is less abundant. The need of treatment is therefore less frequent and resorting to acaricide usage thereby, nonexistent. The global distribution of chemicals (all conventional and unconventional inclusive) throughout the country seems to depend on the

products available on the market in each area and on what is imported from neighbouring countries. For instance, a recent survey conducted in the south of Mali showed that Amitraz is the sole product use in the region (Adakal, unpublished data). This can explain why in Orodara the main product used by farmers is Amitraz.

SP-resistance was surveyed in *R. geygyi* that was chosen as a sentinel species to monitor the impact of tick control. This survey concluded that the control failures perceived by farmers were unlikely to be due to SP-resistance. Indeed field-derived *R. geygyi* ticks displayed similar or even higher susceptibility to deltamethrin and/or alphacypermethrin than the Houndé laboratory strain. The Houndé strain is the first attempt in West Africa to establish a local *Rhipicephalus* (*Boophilus*) reference for monitoring the development of acaricide resistance in cattle ticks there. Absence of significant variation in susceptibility to the SP tested between successive generations of the Houndé strain indicates that the genetic composition of this reference strain is relatively homogenous and that the LPT assays performed in CIRDES provide repeatable results. The need for such a local reference looks important given the great variation in farmers' decision regarding tick control on cattle. This need has recently been further stressed by the discovery of *R. microplus* specimens in Ivory Coast and Benin (Madder et al., 2007). It is speculated that *R. microplus* was imported with bovine originating from Brazil where this species has developed resistances to almost all pyrethroids available (Fernandes, 2001). The invasiveness of *R. microplus* can therefore radically change not only the epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in the region but also the farmers' decisions regarding tick control at a whole. The maintenance of the Houndé strain in CIRDES and the complementary description of its mortality responses for other acaricides (pyrethroids and amidines, (CIRDES, 2007)) may be useful for monitoring the evolution of acaricide resistance in the West African countries that are currently invaded by *R. microplus*.

Acknowledgments

We thank Veterinary services for tick collection assistance, Sébastien ZOUNGRANA and Maurice KONKOBO for laboratory assistance. Funding for this work was provided by French Government through the Fonds de Solidarité Prioritaire (FSP) under contract n° 2000-113.

References cited

- Baker, J.A.F., Joordan, J.O., Robertson, W.D., 1981, A comparison of the resistance spectra to ixodicides of *Boophilus decoloratus* (Koch) and *Boophilus microplus* (Canestrini) in the Republic of South Africa and Transkei, In: Whitehead GB Gibson JD, e. (Ed.) Tick biology and control Tick Research Unit, Rhodes University, Grahamstown, pp. 103-108.
- Baker, M.K., Ducasse, F.B.W., Sutherst, R.W., Maywald, G.F., 1989, The seasonal tick populations on traditional and commercial cattle grazed at four altitudes in Natal. J. S. Afr. Vet. Assoc. 60, 95-101.
- CIRDES 2007. Etude de l'efficacité et de la rémanence de l'Amitraz (TRIPTICK®) sur les tiques *Amblyomma variegatum* et *Boophilus geigyi*: Rapport d'essais expérimentaux (Bobo-Dioulasso, CIRDES), p. 11.
- FAO, 2004, Guidelines resistance management and integrated control in ruminants. Animal Production and Health Division, Agriculture Department. FAO, Rome. 25-77.
- Farougou, S., Kpodekon, M., Tchabode, D.M., Youssao, A.K.I., Boko, C., 2006, Abondance saisonnière des tiques (acari : Ixodidae) parasites des bovins dans la zone soudanienne du Bénin : cas des départements de l'Atacora et de la Donga. Ann. Méd. Vét. 150, 145-152.
- Fernandes, F.F., 2001, Toxicological effects and resistance to pyrethroids in *Boophilus microplus* from Goiás, Brazil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53, 538-543.
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 1994, Ticks and control methods. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 13, 1201-1226.
- Knopf, L., Komoin-Oka, C., Betschart, B., Jongejan, F., Gottstein, B., Zinsstag, J., 2002, Seasonal epidemiology of ticks and aspects of cowdriosis in N'Dama village cattle in the Central Guinea savannah of Côte d'Ivoire. Prev. Vet. Med 53, 21-30.
- LeOraSoftware, 1987, A user's guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Berkeley, CA.
- Madder, M., Thys, E., Geysen, D., Baudoux, C., Horak, I., 2007, *Boophilus microplus* ticks found in West Africa. Exp. Appl. Acarol. 43, 233-234.
- Mattioli, R.C., Janneh, L., Corr, N., Faye, J.A., Pandey, V.S., Verhulst, A., 1997, Seasonal prevalence of ticks and tick-transmitted haemoparasites in traditionally managed N'Dama cattle with reference to strategic tick control in the Gambia. Med. Vet. Entomol. 11, 342-348.
- Miller, L.H.P., McKelvey, J.J., 1977, Immunity to blood parasites of animals and man New York : Plenum Press, 1-132.
- Moreira, C., Schiffers, B., Haubruge, E., 2002. Caractérisation de la résistance au Sénégal d'*Helicoverpa armigera* HUBNER (Lépidoptère, Noctuidae) par bioessai et méthodes moléculaires. In: AFPP - 6ème Conférence Internationale sur les ravageurs en agriculture, Montpellier, 4 - 5 - 6 Décembre.
- Norval, R.A.I., 1983, The ticks of Zimbabwe. VII. The genus *Amblyomma*. Zimbabwe Veterinary Journal 14, 3-18.
- Norval, R.A.I., Barrett, J.C., Perry, B.D., Mukhebi, A.W., 1992, Economics, epidemiology and ecology: a multidisciplinary approach to the planning and appraisal of tick and tick-borne disease control in southern Africa, In: Fivaz, B., Petney, T., Horak, I. (Eds.) Tick vector biology. Medical and veterinary aspects. Springer-Verlag, Berlin, pp. 35-54.
- Norval, R.A.I., Fivaz, B.H., Lawrence, J., Brown, A.F., 1984, Epidemiology of tick-borne diseases of cattle in Zimbabwe. II. Anaplasmosis. Trop. Anim. Health Prod. 16, 63-70.

- Norval, R.A.I., Fivaz, B.H., Lawrence, J.A., Daillecourt, T., 1983, Epidemiology of tick-borne diseases of cattle in Zimbabwe. I. Babesiosis. *Trop. Anim. Health Prod.* 15, 87-94.
- Plowright, W., 1956, Cutaneous streptothricosis of cattle. I. Introduction and epizootiological features in Nigeria. *Veterinary record* 68, 350-355.
- Rechav, Y., 1982, Dynamics of tick populations (Acari: Ixodidae) in the Eastern Cape Province of South Africa. *J. Med. Entomol.* 6, 679-700.
- Roberston, J.L., Preisler, H.K., 1992, Pesticides bioassays with arthropods. CRC, Boca Raton, FL.
- Stachurski, F., 2000. Modalités de la rencontre entre la stase adulte de la tique *Amblyomma variegatum* (Acari, Ixodida) et les bovins : applications potentielles à la lutte contre ce parasite. Thèse de Doctorat ès Sciences. Université de Montpellier II (Sciences et Techniques du Languedoc), Montpellier.
- Stachurski, F., Lancelot, R., 2006, Footbath acaricide treatment to control cattle infestation by the tick *Amblyomma variegatum*. *Med. Vet. Entomol.* 20, 402-412.
- Stone, B.F., Haydock, K.P., 1962, A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). *Bull. Ent. Res.* 53, 563-578.
- Tomassone, L., Camicas, J.-L., Pagani, P., Diallo, O.T., Mannelli, A., De Meneghi, D., 2004, Monthly dynamics of ticks (Acari: Ixodida) infesting N'Dama cattle in the Republic of Guinea. *Exp. Appl. Acarol.* 32, 209-218.

Table 1. Chemical tick control in Burkina Faso: practices and efficiency perception. Tick control practices are described by active chemical, application method and/or intervals between successive applications; the numbers in parentheses refer to the total number of identical answers. Control failures correspond to cases where stockbreeders considered that their cattle were not accurately protected from ticks (see stars in Fig. 1).

Practices and number of farms concerned			Control failures perceived by stockbreeders	
Chemical	Application	Intervals between treatments	N	Farms localization
Insecticides	Plastering (N = 9)	Adjusted to tick burden (N = 9)	0	
Deltamethrin	Spray (N = 18)	Adjusted to tick burden (N = 7)	3	Sidéradougou
		14 days (N = 5)	0	
		7-to-10 days (N = 6)	0	
Alphacypermethrin	Spray (N = 20)	Adjusted to tick burden (N = 16)	9	Diébougou, Manga, Ouagadougou, Pô, Tenkodogo
		14 days (N = 2)	1	Batié
		7-to-10 days (N = 2)	1	Ouagadougou
Amitraz	Spray (N = 6)	Adjusted to tick burden (N = 6)	1	Orodara

Table 2- Stability of acaricide-induced responses along successive generations of the reference Houndé strain. LC₅₀ are expressed in g/l. The generation, number and age of larvae (in days) involved in bioassays are given with estimated slopes and chi-square tests of the goodness of fit (stars indicate a rejection for linearity at $P < 0.01$). Resistance ratios were computed relatively to the F0 generation.

Date of test	Generation	N _{larvae}	Age (d)	Slope ± S.E	χ^2 (d.f.)	LC ₅₀ (95% CI)	RR ₅₀ (95% CI)	RR ₉₉ (95% CI)
Deltamethrine-induced mortality								
26/04/2005	F0	4,339	23	3.6 ± 0.1	188.73 (30) **	0.039 (0.035-0.044)		
12/07/2005	F1	2,843	16	5.3 ± 0.3	9.76 (14)	0.055 (0.052-0.057)	1.39 (1.28-1.52)	0.89 (0.75-1.06)
13/07/2005	F1	5,118	16	3.8 ± 0.1	43.77 (14) **	0.043 (0.041-0.046)	1.10 (1.02-1.20)	1.04 (0.89-1.21)
15/10/2005	F2	1,736	14	3.6 ± 0.2	43.84 (14) **	0.036 (0.032-0.041)	0.93 (0.84-1.03)	0.97 (0.80-1.18)
13/10/2008	F12	1,748	8	3.9 ± 0.2	16.95 (14)	0.041 (0.038-0.044)	1.04 (0.94-1.14)	0.95 (0.79-1.15)
Alphacypermethrine-induced mortality								
13/04/2005	F0	5,629	16	2.9 ± 0.1	140.04 (14) **	0.038 (0.032-0.045)		
19/04/2005	F0	6,382	20	3.3 ± 0.1	304.25 (30) **	0.045 (0.041-0.049)	1.07 (1.01-1.13)	0.91 (0.80-1.03)
15/07/2005	F1	1,953	18	3.9 ± 0.1	22.98 (14)	0.036 (0.034-0.039)	0.87 (0.81-0.94)	0.58 (0.49-0.69)
19/07/2005	F1	4,553	20	4.0 ± 0.1	78.74 (30) **	0.029 (0.027-0.031)	0.69 (0.66-0.73)	0.45 (0.39-0.51)
22/06/2006	F5	1,743	13	3.4 ± 0.1	50.30 (14) **	0.047 (0.042-0.055)	1.14 (1.05-1.23)	0.96 (0.80-1.15)
14/10/2008	F12	1,711	9	3.9 ± 0.2	31.06 (14) **	0.033 (0.030-0.036)	0.79 (0.73-0.85)	0.52 (0.44-0.62)

Table 3- Deltamethrin bioassays in offspring of field-females. LC₅₀ are expressed in g/l. The number and age of larvae (in days) involved in bioassays are given with estimated slopes and chi-square tests of the goodness of fit (stars indicate a rejection for linearity at $P < 0.01$). Resistance ratios computed relatively to the Houndé reference strain at LC₅₀ and LC₉₉ appeared in bold characters when above 1.

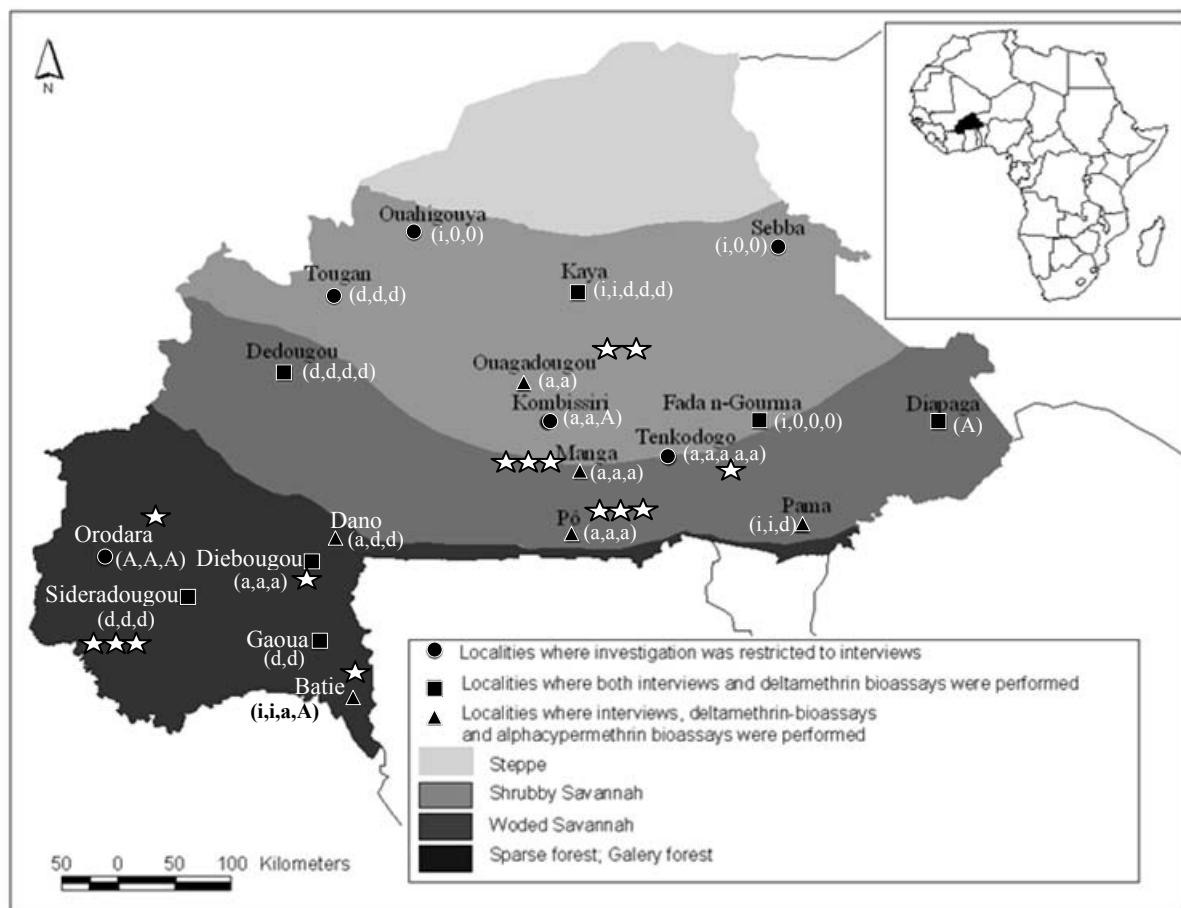
Sample	(N _{larvae})	Age (d)	Slope \pm S.E.	χ^2 (d.f.)		LC ₅₀ (95% CI)	RR ₅₀ (95%CI)	RR ₉₉ (95%CI)
Houndé-strain	(1,636)	14	3.4 \pm 0.1	164 (14)	**	0.036 (0.028-0.047)	-	-
Batié	(1,636)	20	4.0 \pm 0.1	104 (30)	**	0.025 (0.023-0.027)	0.68 (0.63 - 0.75)	0.55 (0.46 - 0.67)
Dano	(3,491)	20	3.9 \pm 0.1	67 (14)	**	0.031 (0.028-0.034)	0.84 (0.78 - 0.93)	0.70 (0.58 - 0.87)
Débougou	(1,733)	14	3.5 \pm 0.1	47 (14)	**	0.034 (0.031-0.038)	0.94 (0.86 – 1.04)	0.90 (0.73 – 1.12)
Diapaga	(1,679)	17	4.6 \pm 0.2	39 (14)	**	0.026 (0.024-0.028)	0.71 (0.65 – 0.78)	0.48 (0.40 – 0.60)
Diébougou	(1,819)	21	4.4 \pm 0.2	47 (14)	**	0.027 (0.024-0.030)	0.74 (0.68 – 0.81)	0.53 (0.44 – 0.65)
Fada N’Gourma	(1,939)	16	3.3 \pm 0.1	46 (14)	**	0.035 (0.032-0.040)	0.98 (0.90 – 1.07)	1.06 (0.86 – 1.32)
Gaoua	(2,911)	14	5.5 \pm 0.1	337 (22)	**	0.017 (0.016-0.020)	0.48 (0.45 - 0.52)	0.27 (0.23 - 0.33)
Kaya	(1,905)	16	4.1 \pm 0.2	32 (14)	**	0.041 (0.037-0.045)	1.13 (1.04 -1.24)	0.89 (0.73 -1.10)
Kombissiri	(1,673)	20	4.1 \pm 0.2	71 (14)	**	0.027 (0.024-0.032)	0.76 (0.70 – 0.83)	0.59 (0.48 – 0.74)
Manga	(1,827)	18	5.5 \pm 0.3	29 (14)	**	0.019 (0.018-0.021)	0.52 (0.49 – 0.57)	0.29 (0.24 – 0.36)
Ouagadougou	(1,590)	17	4.8 \pm 0.2	34 (14)	**	0.031 (0.028-0.034)	0.85 (0.78 – 0.93)	0.55 (0.45 – 0.68)
Pama	(3,892)	17	3.8 \pm 0.1	113 (30)	**	0.027 (0.026-0.029)	0.75 (0.70 – 0.82)	0.65 (0.55 – 0.79)
Pô	(1,769)	19	17.3 \pm 1.1	30 (14)	**	0.012 (0.011-0.012)	0.32 (0.30 – 0.35)	0.09 (0.08 – 0.11)
Sidéradougou	(1,871)	14	3.8 \pm 0.2	59 (14)	**	0.052 (0.045-0.061)	1.45 (1.33 – 1.59)	1.25 (1.02 – 1.56)

Table 4- Alphacypermethrin bioassays in offspring of field-females. LC₅₀ are expressed in g/l. The number and age of larvae (in days) involved in bioassays are given with estimated slopes and chi-square tests of the goodness of fit (stars indicate a rejection for linearity at $P < 0.01$). Resistance ratios computed relatively to the Houndé reference strain at LC₅₀ and LC₉₉ appeared in bold characters when above 1.

Sample	(N _{larvae})	Age (d)	Slope \pm S.E.	χ^2 (d.f.)	LC ₅₀ (95% CI)	RR ₅₀ (95%CI)	RR ₉₉ (95%CI)
Houndé-strain	(2,255)	15	3.9 \pm 0.2	32 (14) **	0.031 (0.029-0.033)	-	-
Batié	(1,574)	20	3.4 \pm 0.3	53 (30) **	0.023 (0.020-0.025)	0.72 (0.67 - 0.79)	0.89 (0.72 – 1.11)
Dano	(1,773)	20	5.0 \pm 0.2	13 (14)	0.018 (0.017-0.019)	0.59 (0.55 - 0.64)	0.44 (0.37 - 0.54)
Manga	(1,635)	18	5.1 \pm 0.2	22 (14)	0.021 (0.020-0.023)	0.69 (0.65 – 0.75)	0.50 (0.42 – 0.61)
Ouagadougou	(1,863)	18	3.0 \pm 0.1	58 (14) **	0.022 (0.019-0.024)	0.71 (0.66 – 0.77)	1.05 (0.85 – 1.30)
Pama	(1,556)	17	3.3 \pm 0.1	68 (30) **	0.022 (0.020-0.025)	0.72 (0.67 – 0.79)	0.91 (0.74 – 1.14)
Pô	(1,700)	19	6.6 \pm 0.4	91 (14) **	0.013 (0.012-0.014)	0.42 (0.40 – 0.45)	0.24 (0.20 – 0.29)

Figure captions

Figure 1 : Sampling and of tick control practices. Insert recalls the position of Burkina Faso (2-5 °E, 10-15°N) in Africa. The localities where stockbreeders were interviewed are indicated with their answers coded as follows (in parentheses, one answer per stockbreeder): 0: refer to ‘no chemical-based tick control programs’; i: ‘agricultural insecticides plastered on cattle’ A: ‘cattle sprayed with Amitraz’; a: ‘cattle sprayed with alphacypermethrin’ and d: ‘cattle sprayed with deltamethrin’. Stars indicated farms whose owners reported tick control failures.



3 Conclusions

Les résultats de cette étude montrent que le contrôle des tiques au Burkina Faso est relativement peu encadré avec notamment une absence de règles dans l'usage que les éleveurs font des produits acaricides. L'étude fait ainsi apparaître un grand nombre de mauvaises pratiques mais aussi de mauvaises compréhensions qui pourraient les expliquer. En résumé, à quelques exceptions près les applications ne sont pas planifiées mais liées à une appréciation visuelle de la charge parasitaire. Cette pratique ne permet pas de bloquer la transmission de la maladie, les vecteurs ayant le temps, et en nombre important, de transmettre des agents pathogènes et/ou de causer des dommages physiques à l'animal avant d'être éliminés par traitement. Un autre problème est semble-t-il l'utilisation inefficace mais réelle de formulations agricoles inadaptées. Toutefois les éleveurs seraient au courant de l'interdiction d'application de ces molécules sur le bétail mais masqueraient cela en donnant de fausses réponses aux enquêtes, ce qui biaise les résultats d'enquête.

Par ailleurs un autre aspect très important de l'étude publiée dans cet article à savoir l'évaluation de la résistance des tiques aux pyréthrinoïdes, apporte des éléments encourageants. En effet, malgré les problèmes de mauvaise utilisation et mauvaise gestion des acaricides, aucune résistance n'est détectée sur le terrain sur *Boophilus* spp ; les rapports d'échec semblent être essentiellement liés au non respect des procédures et recommandations d'utilisation. Il est donc légitime de considérer que cet état de fait s'étend aux tiques du genre *Amblyomma* et que par conséquent là non plus aucune résistance établie ne pourrait influencer sur la dynamique de circulation de la cowdriose.

CHAPITRE 3

Développement de stratégies alternatives de lutte intégrée contre les tiques

1 Contexte d'étude

La biologie d'*A. variegatum*, vecteur de la cowdriose, a été largement étudiée au Burkina Faso, grâce aux travaux de Frédéric Stachurski (Stachurski, 2000a; Stachurski, 2000b; Stachurski, 2006; Stachurski et Lancelot, 2006). En effet, *A. variegatum* est jugée comme la plus préjudiciable des tiques du bétail en Afrique de l'Ouest, aussi bien par les éleveurs que par les services vétérinaires. Par conséquent, tous les moyens de lutte mis en œuvre sur le terrain sont alors dirigés contre elle, et précisément contre les tiques adultes (mâles et femelles) qui sont actives en saison de pluies. Aussi les études qui ont porté en majeure partie sur la connaissance de la biologie d'*A. variegatum*, ont-elles été conduites en vue de trouver des moyens de lutte qui soient adaptés au contexte socio-économique de l'éleveur burkinabè et de l'Afrique de l'Ouest en général (Stachurski, 2000b; Stachurski et Lancelot, 2006). Ces travaux ont donné des précisions sur le mode d'invasion des bovins par *A. variegatum* dont le stade adulte (mâle et femelle) s'attache temporairement entre les onglons avant d'atteindre ses sites de fixation définitifs qui sont les parties déclives. Le traitement du bas des pattes par passage des animaux dans un pédiluve contenant une solution acaricide s'est avéré très efficace pour éliminer les tiques avant leur déplacement vers les sites préférentiels de fixation définitive. L'efficacité du pédiluve contre *A. variegatum*, et plus récemment contre les glossines vecteurs des trypanosomoses, a été validée par de nombreuses études en situations expérimentales et réelles (Bouyer *et al.*, 2006; Stachurski, 2000b; Stachurski et Lancelot, 2006). Dix ans après la construction du premier pédiluve, la diffusion de la technique s'est faite à travers deux projets de développement avec 21 pédiluves construits par le projet ARIOPE dans des coopératives d'éleveurs modernes de la périphérie de Bobo-Dioulasso et Ouagadougou, et 21 autres par le projet PAEOB dans des coopératives

d'éleveurs traditionnels du bassin du Mouhoun (**figure 3**). Une étude de la perception de l'outil ainsi que du niveau d'adoption de la méthode a été récemment conduite par Bouyer F. et *al.* (en prép.), et les résultats seront bientôt publiés. Il en ressort d'ores et déjà que le type de système d'élevage joue un rôle prépondérant dans l'adoption avec 90%, 20% et 13% respectivement au niveau des éleveurs modernes de Ouagadougou et de Bobo-Dioulasso et au niveau des éleveurs traditionnels du bassin du Mouhoun.

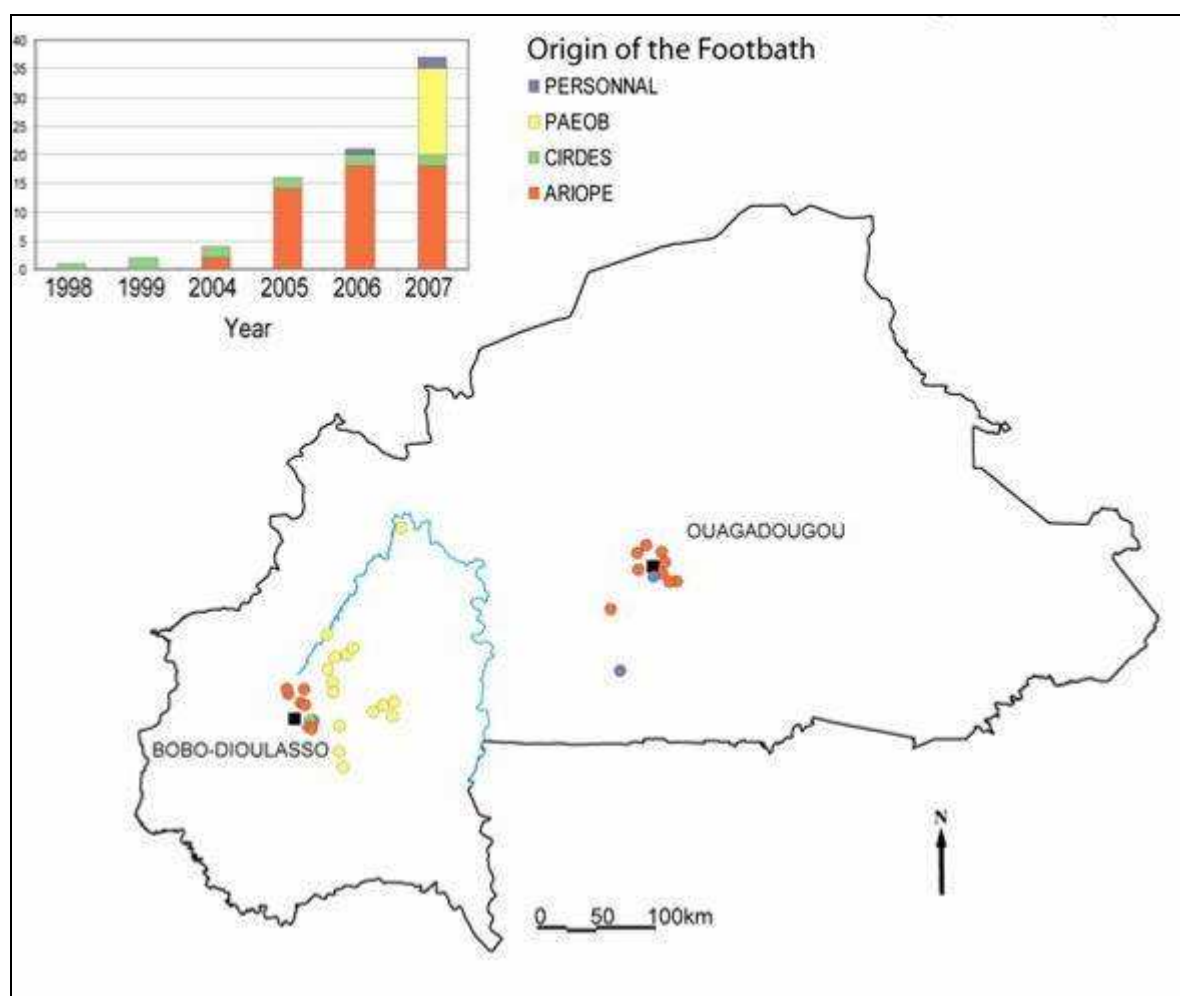


Figure 4 : Evolution du nombre de pédiluves installés au Burkina de 1998 à 2007. Données non publiées, F. Bouyer et al, 2009).

Malgré la preuve formelle de l'efficacité du pédiluve, sa diffusion sur le terrain reste problématique au regard du niveau d'adoption par les éleveurs traditionnels qui constituent la majeure partie du système d'élevage burkinabè : beaucoup d'éleveurs n'ayant pas eu une bonne première expérience du pédiluve et ne le trouvant donc pas suffisamment efficace pour

tuer les tiques, retournent aux méthodes traditionnelles de lutte et à la pulvérisation. En milieu traditionnel, l'accompagnement des organisations paysannes s'avère essentiel afin de permettre une mise en œuvre technique et organisationnelle du traitement par pédiluve. De plus, dans un contexte de préservation de l'environnement, la recherche de méthodes alternatives et/ou complémentaires est nécessaire afin de réduire le recours aux acaricides.

2 Objectifs de l'étude

L'objectif principal est d'évaluer s'il est possible de réduire la densité des adultes d'*A. variegatum* sur le pâturage par une gestion raisonnée du parcours des troupeaux au cours de la période d'infestation par les nymphes c'est-à-dire en saison sèche. Une telle démarche devrait compléter les dispositifs déjà en place, dont l'efficacité doit certes être améliorée, afin d'assurer un niveau d'infestation des animaux compatible avec l'établissement de la stabilité enzootique.

3 Rythme de détachement des nymphes gorgées d'*A. variegatum*

Les adultes d'*A. variegatum* infestent leurs hôtes en début de saison humide, alors que les nymphes se gorgent pendant la saison sèche. Les larves quant à elles, sont présentes de la fin de la saison humide jusqu'au début de la saison sèche. Une des caractéristiques du cycle biologique d'*A. variegatum* est le détachement des divers stades après gorgement. Dans le cas des nymphes, la distance parcourue par ces nymphes détachées est très faible et il faut que l'adulte lors de l'émergence puisse facilement trouver un hôte pour survivre. La distribution et le rythme de détachement des nymphes gorgées conditionnent alors la distribution et la survie des adultes qui en sont issues. Identifier le rythme de détachement des nymphes gorgées et les conditions qui déterminent ce détachement peut à la fois apporter des éléments pour la mise en place d'un système de lutte raisonnée jouant sur le comportement du vecteur et ne faisant pas appel à l'usage d'acaricides mais aussi permettre de mieux comprendre l'influence de la dynamique des tiques sur celle de la maladie transmise.

Les essais ont d'abord été conduits à l'étable du CIRDES puis les résultats obtenus ont pu être validés sur le terrain. Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article ci-après qui a été soumis à *Parasitology*.



**Exploiting the heterogeneous drop off rhythm of
Amblyomma variegatum nymphs to reduce pasture
infestation by adult ticks**

Journal:	<i>Parasitology</i>
Manuscript ID:	PAR-2009-0427.R1
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	23-Nov-2009
Complete List of Authors:	STACHURSKI, Frédéric; CIRAD, UMR 15 ADAKAL, Hassane; CIRDES, BIOS
Key Words:	Amblyomma variegatum, cattle, drop off rhythm, herd management, integrated tick control

**Exploiting the heterogeneous drop off rhythm of
Amblyomma variegatum nymphs to reduce pasture
infestation by adult ticks**

F. STACHURSKI^{1,2,*}, H. ADAKAL²

1. Centre International de Recherche en Agriculture pour le Développement (CIRAD), UMR 15
CIRAD/INRA « Contrôle des Maladies », Campus International de Baillarguet TA-A15/G, 34398
Montpellier Cedex 5, France
2. Centre International de Recherche-Développement sur l’Elevage en zone Subhumide (CIRDES), BP
454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

Running title: Using *A. variegatum* nymph characteristics to reduce adult density

* Corresponding author. Present address: F. Stachurski, Direction Régionale du CIRAD, BP 853,
Antananarivo 101, Madagascar. Tel: +261 32 07 235 27. Fax: +261 20 22 408 21.
E-mail: frederic.stachurski@cirad.fr

- 2 -

SUMMARY

Tick distribution depends on the drop off rhythm of the previous stage and on the suitability for tick survival of the environment where they are disseminated. Studies were implemented in Burkina Faso to assess detachment pattern of engorged *Amblyomma variegatum* nymphs. Experiments were carried out with naturally infested cattle kept in a paddock or monitored when grazing community pasture. In the pasture, 80% of the nymphs detached between 14h00 and 17h00 while less than 25% did so in the paddock. Further investigation was implemented to assess whether density of adult ticks might be modified by herd management. During the early dry season, zebus grazed in four plots fenced in natural savannahs and fallows. Two of the plots were used in the morning and the two others in the afternoon. Six months later, zebus were put in these plots in turn, on 9 occasions. The number of *A. variegatum* adults picked up by the cattle in each plot was highly variable: they captured more ticks in the plots installed on good lush savannah and 3-fold more ticks in those where the herd had grazed in the afternoon during the previous dry season. An integrated tick control strategy taking these results into account is proposed.

Key words: *Amblyomma variegatum*, cattle, drop off rhythm, herd management, integrated tick control

INTRODUCTION

Amblyomma variegatum is considered as the most harmful tick species in West Africa. Its life-cycle has a very pronounced seasonality under tropical climates with a single rainy season (Petney *et al.* 1987). Adults infest their hosts mainly during the beginning of the rainy season; larvae attach late in the same season and disappear at the onset of the dry season; nymphs engorge during the dry season with an infestation peak occurring 4-8 weeks after its onset. Immature stages of *Rhipicephalus appendiculatus* (Norval *et al.* 1988) and *A. hebraeum* (Norval *et al.* 1989) do not cause quantifiable weight loss; this is also the case for *A. variegatum* of which only the adults cause important direct losses to cattle (Stachurski *et al.* 1993). This leads the farmers to control specifically this stage by manual tick removal or through application of chemical acaricides.

Considering that engorged nymphs do not move over long distances to find a moulting place once they have detached, the distribution of unfed adults is mainly determined by nymph drop off rhythm and by tick survival in the environment (Minshull & Norval, 1982). Determining the tick drop off pattern and/or identifying factors influencing their detachment may thus lead to propose measures which could be part of an integrated tick control strategy. Minshull (1982) considered that “advantages could be taken of the well defined drop off patterns exhibited by all three stages of *R. appendiculatus*” and proposed to delay the movement of cattle from the paddock to the pastures since most engorged females detach early in the morning. Bianchi & Barré (2003) noted that host movement can induce *Boophilus microplus* drop off and that a 20-40 minutes walk speeds up the morning detachment of engorged females. They suggested putting these findings to good use “by cleaning up the dairy cattle before they return to pasture”.

Drop off rhythm of *A. variegatum* nymphs has been studied in Guadeloupe by Barré (1989) who found that most of them detached in the morning. On the other hand, Rechav (1978) observed that nymphs of *A. hebraeum* dropped off mainly in the late afternoon and Mohammed *et al.* (2005) that *A. lepidum* nymphs detach at 18h00 or 22h00 according to the season. Since these divergent findings have different implications regarding possible control measures, studies were carried out in Burkina Faso to identify the detachment rhythm of *A. variegatum* nymphs. In the light of the results, a further experiment was implemented to assess whether it was possible to reduce the density of *A. variegatum* adults in the pasture through proper herd management.

MATERIALS AND METHODS

Experimental site and animals

Two different experiments were carried out to determine *A. variegatum* nymph detachment rhythm. The first one involved 4 naturally infested cattle temporarily removed from their herds and kept during 6 days in CIRDES facilities (Bobo-Dioulasso), in a 12 m² paddock adjacent to a cowshed and surrounded by moats filled with soapy water to prevent tick escape. The second experiment took place in herds belonging to Fulani cattle breeders settled for several decades in villages located 15 km (herd A) and 13 km (herd C) east of Bobo-Dioulasso. The monitored herds comprised 65 (herd A) and 52 (herd C) zebus, Baoulé and cross-bred animals. Only zebu and cross-bred cattle were involved in the study; cattle monitored in CIRDES paddock were cross-bred coming from these herds.

The experiment carried out to check whether it was possible to lower pasture infestation through herd management was implemented in a 10-ha farm located 8 km west of Bobo-Dioulasso. The monitored herd comprised 38 Gudali zebus which grazed on community pasture in addition to the farm private land. The whole herd was involved in the first part of the study during which engorged nymphs were naturally scattered on the pastures by the infested cattle. Four, and then 6 zebus of the herd, randomly chosen among the bull-calves and heifers and weighing more than 150 kg, were used for the second part of the study during which the adult ticks present in the pasture were captured by these “trap-cattle”.

The tropical climate in the region is characterised by a mean annual rainfall of 1,050 mm. The rainy season occurs from mid-May to early October (Diallo *et al.* 1998). The natural vegetation is a woody and bushy savannah.

Experiments in CIRDES paddock

Cattle chosen because of their high nymph infestation were examined as soon as they arrived in the paddock. Clusters of attached ticks were delimited by lines drawn on the skin with a marker pen which allowed the establishment of a precise diagram of tick distribution. Animals were then examined daily on several occasions. Each alteration (tick starting the final engorgement phase, which is identifiable by a change in colour, from brown to grey [Barré, 1989]; detachment of an engorged nymph;

disappearance of a nymph before engorgement) was immediately recorded on the diagram. During the first trial, the nymphs were checked 5 times daily, at 6h30 (just after dawn), 9h30, 12h00, 14h30 and 17h30 (just before dusk). During the second trial, the schedule was modified to take into account the results of the first trial and field observations according to which herds are coming back from pasture only at sunset or up to 20-30 minutes later. Ticks were therefore checked at 6h30, 9h30, 12h00, 15h00, 17h00 and 18h30. This last tick count was carried out by lamplight.

Field assessment of drop off rhythm

A year later, in November-December 1999, a similar study was carried out with naturally infested cattle grazing on community pasture. During 4 weeks, 4 animals chosen in herd A (weeks 1 and 3) or in herd C (weeks 2 and 4) were examined during 4 successive days according to the protocol described above: the distribution of delimited nymph clusters was reported on a diagram and attachment, engorgement and drop off of the ticks were regularly checked and recorded. Some animals were monitored during two trials, others only once. Every morning, a 10 metres rope was tied around the horns of the chosen animals which allowed their catching and examination in the pasture. The first tick count took place just before the herd left the night paddock, between 9h30 and 10h45 according to day and herd (10h05 on average), and the last one just after the herd came back from pasture, between 18h00 and 19h00 (18h20 on average), generally by lamplight. In the meantime, the monitored cattle were examined on 4 occasions, at 11h00, 14h00, 15h30 and 17h00.

Alteration of the density of A. variegatum adults in the environment

In Bobo-Dioulasso region, almost all livestock graze community pasture: it was then difficult to identify a farm where fences could be installed. The land of the chosen farm (herd T) was not very wide, part of it was covered by crop fields and the vegetation was very heterogeneous with regard to the available biomass (Fig. 1). Four plots were delimited with wire fences to define two groups of two plots of irregular shape but with similar size and vegetation in each group. P1 and P2, partly installed on woody lush savannah, were regarded as more suitable for tick survival than P3 and P4 placed on poor fallows and stony/bushy savannah. P1 and P4 were randomly selected to be grazed, during the dry season, from 8h30 to 11h30, whereas P2 and P3 were grazed between 15h00 and 18h00. The herd

- 6 -

grazed alternately these plots and community pasture where cattle could drink from a river. Community pasture was used every other day through the whole day and from 11h30 to 15h00 when the plots were grazed, according to the schedule described in Table 1. This first part of the study took place from 01/12/03 to 12/01/04 and was stopped because cattle infestation had become too low and because there was no more grass in the plots. These remained unused until the next rainy season.

Between 26/05 and 02/07/04, the plots were grazed in turn by the monitored cattle, each plot being used on 9 occasions, from 9h15 to 17h30. The grazing order of the plots was randomly determined (Table 1). The 4-day period during which the cattle successively grazed the four plots is designated as a "passage". During the first 7 passages, the group consisted of the same 4 zebus; 2 zebus were added for the 2 last passages in order to capture as many ticks as possible before the grass was completely grazed.

During the dry season, herd infestation was assessed once a week by tick counts carried out on 5 randomly chosen animals. During the rainy season, the monitored animals were examined twice a day, before and after each grazing session; all ticks were systematically removed.

Data analysis

Comparison of tick numbers or percentage between animals, plots or days was done by Chi² test. P-values below 0.05 were considered as significant.

RESULTS

Experiments in the paddock

The engorgement and detachment of 203 nymphs was monitored. Seventy percent of these nymphs had been located during the first cattle examination, the others being spotted for the first time up to 5 days later, although no tick could attach in the paddock. Despite very careful examination of the animals involved in the second trial, this proportion was not significantly reduced (26% vs 36%; Chi² = 2.3, P > 0.10).

The detached nymphs (3 of which disappeared without being previously seen engorged) dropped off mainly in the afternoon or in the night, particularly during the second trial for which an additional control was performed after sunset (Fig. 2). There was no difference in the drop off pattern

between the 2 cattle monitored during the first trial ($\text{Chi}^2 = 2.3$, $P > 0.50$), unlike during the second one: 64% of the nymphs engorged on animal n°123 detached in the afternoon (38% for n°4440) whereas 7% detached in the morning (30% for n° 4440; $\text{Chi}^2 = 13.4$, $P < 0.01$). Considering the hourly drop off rate, there was two drop off peaks: a main peak in the afternoon or soon after sunset and a lower peak in the morning, after the first tick count. On the other hand, few nymphs detached during the midday hot hours.

Experiments in the field

During the 16-day study, 1,213 nymphs disappeared from the monitored cattle. Sixty-four (5%) were not seen engorged or semi-engorged before detachment and most of them (53 of 64) disappeared during the night. The nymph detachment pattern, all data being merged in a single 24-hour period, was very heterogeneous. Fifty per cent of the ticks detached between 15h30 and 17h00 and 29% between 14h00 and 15h30 (Fig. 3). Only 6% of the nymphs dropped off in the night pen although the cattle spent there the two thirds of the study period.

The detachment rhythm was rather similar for all the monitored cattle: the percentage of nymphs dropping off between 14h00 and 17h00 varied from 69% to 88% according to the host. There were however significant differences between animals in both herds (herd A: $\text{Chi}^2 = 16.5$, $P < 0.05$; herd C: $\text{Chi}^2 = 43.6$, $P < 0.001$) (Fig. 4). The detachment rhythm varied also sometimes according to the day. It was homogeneous during the first week (no significant difference between the 4 days; $\text{Chi}^2 = 20$, $P > 0.05$), more variable during weeks 3 and 4 ($\text{Chi}^2 > 30$, $P < 0.01$), and dramatically heterogeneous during week 2 ($\text{Chi}^2 = 109$, $P < 10^{-17}$). Unlike the usual pattern, more ticks detached between 14h00 and 15h30 on several occasions (Fig. 5).

There was a high difference between the drop off patterns observed in the field and in the paddock, fewer ticks detaching during the night and morning in the field. Six per cent of the nymphs disappeared between 18h20 and 10h05 in the field, whereas 43% did so between 18h30 and 9h30 during the second paddock trial, and 58% during the first one for a period starting one hour earlier ($\text{Chi}^2 = 300$, $P < 10^{-50}$).

Monitoring of herd T during the dry season

- 8 -

The herd started to graze the plots shortly before the nymph infestation peak. Each of the 4 plots was used on 11 occasions. The mean infestation of the zebus varied from 65 nymphs per animal (01/12) to 15 nymphs per animal (12/01), with a peak at 82 ticks on 09/12/03.

Capture of A. variegatum adults during the rainy season

When the second phase of the study started, the herd was already infested since *A. variegatum* adults had been active for a few weeks. On the first morning, the 4 monitored zebus harboured 89 *A. variegatum* (69 males, 19 females and 1 nymph) together with other ticks (*Hyalomma*, *Rhipicephalus* and *Boophilus*). All these ticks were manually removed, as were also removed those found attached to the monitored cattle on the next 35 mornings: 79 *A. variegatum* males (74 of which attached to the predilection sites: udder or groin, chest and axilla, perineal area), 9 females (7 of which attached to the inter-digital areas) and 45 nymphs, as well as other ticks including 262 *Hyalomma* (79 of which attached to the inter-digital areas).

During the 36 days of the study (9 passages in each plot), the animals picked up 1,395 adult *A. variegatum*: 216 in plot P1, 671 in plot P2, 370 in plot P3 and 138 in plot P4. The total number of ticks captured by the zebus decreased from 313 for the first passage to 75 for the 7th; it increased then slightly during the final passages, when two animals were added (Table 2). Diurnal rains occurred on three occasions during the study (Table 2). Two of the rainy days were contemporaneous with a reduced number of captured ticks in comparison with the previous and next passages in the same plot.

More males (854) than females (541) were captured, but sex ratio changed during the course of the experiment: 71% of the picked up ticks were males during the first 3 passages, but only 40% during the last 3 passages. Eighty-nine percent of the 1,395 ticks captured in the plots attached to the inter-digital areas.

The number of picked up adults depended strongly on the vegetation in the plots. Although P3 and P4 were 50% larger than their counterpart installed on lush savannah and used in the same half-day during the previous dry season, the zebus captured less ticks there than in P1 (57% more than in P4) or in P2 (81% more than in P3). When the plots with same size and vegetation were compared, it appeared that the number of *A. variegatum* adults captured in the plots grazed in the afternoon during the previous dry season was higher than that captured in the plots grazed in the morning. In these

latter, the cattle picked up nearly 3-fold fewer *A. variegatum* adults (3.1-fold fewer for P1 compared to P2, $\text{Chi}^2 = 233$, $p < 10^{-50}$; 2.7-fold fewer for P4 compared to P3, $\text{Chi}^2 = 105$, $p < 10^{-24}$).

The monitored cattle also captured *A. variegatum* nymphs, *Rhipicephalus spp.* adults and 820 *Hyalomma spp.* adults in the plots. Most of the *Hyalomma* (75%) attached to the inter-digital areas.

DISCUSSION

During the study carried out in the field, 64 of the 1,213 monitored nymphs disappeared without being seen semi-engorged before, mostly during the night. It was therefore not possible to know whether they died, were removed by the hosts, moved from one cattle to another, or engorged before detaching. However that may be, not more than 5% of the attached *A. variegatum* nymphs were removed or killed by grooming or by cattle immune reaction. Grooming, which is considered as an important tick control method for antelopes and gazelles but also for cattle infested with *B. microplus* (Hart, 1994), thus does not seem efficient against *A. variegatum* nymphs.

During paddock and field studies, clear heterogeneous drop off rhythms were observed although patterns were not similar. In the paddock, the nymphs detached mostly in the afternoon (14% per hour between 16h00 and 19h00) but also in the morning (5% per hour from 07h00 to 10h00). In the field, the detachment pattern was even more heterogeneous with about 80% of the ticks detaching between 14h00 and 17h00 (26% per hour) and less than 0.5% of the ticks detaching hourly between 19h00 and 11h00. For both experiments, few nymphs detached during the hottest hours. Rechav (1978) mentioned similar results with *A. hebraeum* nymphs infesting rabbits: 70% of the ticks dropped off during the last 4 hours of the day. Conversely, Barré (1989) observed in Guadeloupe that the detachment peak of *A. variegatum* nymphs occurred in the morning, between 08h00 and 10h00.

How can one explain the difference? Rechav (1978) showed that modification of the photoperiod altered tick drop off rhythm: the nymphs detached later when hosts and ticks were permanently maintained in darkness. Bianchi & Barré (2003) stated that “movement of steers is one of the major factors that stimulate detachment of the ticks”. Barré’s results were obtained with ticks put in cloth bags stuck on the skin of caged goats: the ticks did not experience normal daylight and hosts could not move readily. Differences between *A. variegatum* from Guadeloupe and from Burkina Faso might also result from local adaptation to climatic and/or environmental conditions. Ticks of various origins

- 10 -

should be studied in the same conditions to test this hypothesis.

As for CIRDES paddock, one third of the surface was under a platform and the west side was adjacent to a building which both provided shade in the afternoon. Cattle did not have a large area to move while farmer herds can walk up to 10-12 km per day at that period. These conditions, even if they did not create complete darkness or total host immobility, may have modified the light and host movements perceived by the nymphs and therefore detachment pattern. Wrong conclusions might then be drawn from studies carried out in “near natural” conditions.

Although detachment pattern was quite consistent during the study, the rhythm varied according to day and host. Bianchi & Barré (2003) noticed not only that host movements stimulate *B. microplus* detachment but also that sunlight may influence tick detachment. This was also postulated by Rechav (1978) who stated that “light is the dominant synchronizer affecting the endogenous rhythms”. Could sunlight variations during the field study explain the daily differences of detachment pattern? As these variations were not recorded, it is impossible to determine. On the other hand, cattle in the same herd have different behaviours. Some are always at the front of the herd, others are walking slowly behind, some are covering greater distances than more indolent animals, etc. These differences might also have influenced the *A. variegatum* nymph drop off rhythm and could explain the host-related variations of detachment pattern observed in the field and in the paddock.

It has been postulated that drop off regulation results from the synchronization with host behaviour, allowing moulting to occur in a suitable environment where host finding by the next stage could be easier (Rechav, 1978; Belozerov, 1982). Mohammed *et al.* (2005) stated thus that evening detachment of *A. lepidum* nymphs attached within cotton bags fixed around sheep scrotum (the distribution of this tick occupies more arid areas than that of *A. variegatum* [Petney *et al.* 1987]), occurring at 18h00 or 22h00 according to the season, increases the “chance to encounter the next host”. *A. variegatum* nymphs drop off rhythm seems also adapted to main host behaviour. When detaching during the last third of the photophase, engorged nymphs can limit desiccation and have 15-18 hours of favourable climatic conditions to find a micro-habitat appropriate for survival. Dropping off the hosts earlier would expose the ticks to the hottest hours which could lead to high mortality. Wilkinson (1970) thus assumed that *B. microplus* was missing in some Australian regions because of the too hot temperature at ground level. Conversely, if engorged nymph detachment would occur later,

when the cattle are back in the kraal, ticks would be in a very unfavourable environment: no bushes or clumps of grass of which the root network could protect them from the desiccation, high risk of crushing by the cattle, high risk of predation by chickens which are efficient predators (Morel, 1974; Hassan *et al.* 1991; Dreyer *et al.* 1997). Finally, unfed adults would hardly find hosts in the kraal since they are generally moved onto harvested fields during the dry season so that manure can fertilize the soil; but cattle are no longer brought in these fields during the following rainy season.

Considering the important differences between the detachment patterns observed in the paddock and in the field, only the latter results were regarded as representative. Despite some daily or host variations, near 80% of the engorged *A. variegatum* nymphs detached between 14h00 and 17h00. An experiment was therefore carried out to determine whether one could exploit this detachment pattern to modify tick density in the fields.

During this latter study, the collected data gave indications as regards tick biology. It appeared that heavy rains hampered movements of *A. variegatum* adults, which had already been observed during other studies (Stachurski, 2000b); this is probably due to the host-seeking behaviour of the ticks which are not waiting at the top of the vegetation but are actively walking on the ground to reach the potential host. The invasion process of *A. variegatum* adults was confirmed: the majority of the ticks captured in the pasture attached to the inter-digital areas and moved towards the predilection sites at night, when the animals are lying down in the night pen. On this occasion, movements from one cattle to another may occur (Stachurski, 2000a). This may explain why, despite the evening manual removal of the captured ticks, monitored animals were infested in the morning by some *A. variegatum* adults, coming from other cattle of the herd, and why these ticks were mainly attached to the predilection sites. The very low number of female ticks found attached to the cattle in the morning and the fact that, unlike males, these were mainly attached to the inter-digital areas, are also consequences of the biological characteristics of *A. variegatum*: females do not usually attach to the predilection sites until males have started to produce aggregation-attachment pheromone, 3-5 days after attachment (Norval & Rechav, 1979). The low proportion of females among the ticks captured at the beginning of the study is also partly due to this characteristic. In addition, females need higher humidity at soil level to display host-seeking activity (Stachurski, 2006).

Collected data suggested that cattle invasion by the *Hyalomma* ticks present in the area (mainly

- 12 -

H. marginatum rufipes and *H. truncatum*) may also take place in the same manner. Seventy-five percent of the ticks found in the evening were attached to the inter-digital areas; monitored cattle were infested in the morning despite evening tick removal; and only 30% of the nightly attached *Hyalomma* were found on the feet.

Regarding *A. variegatum* adults, more ticks were picked up in the plots with denser vegetation than in those installed on stony savannah and fallows, even though these latter were larger. This confirmed that the presence of favourable micro-habitats for nymph moulting and survival in the pastures greatly influences adult distribution (Minshull & Norval, 1982).

Herd management during the dry season can influence the number of *A. variegatum* adults present in the pasture 6 months later: cattle picked up nearly 3-fold more *A. variegatum* in the plots grazed in the afternoon during the nymph infestation period in comparison with those grazed in the morning. How could livestock owners implement a tick control method using this observation? Where could they bring their animals during the nymph drop off periods, i.e. in the afternoon, to prevent pasture infestation? One solution could be to bring back the herd to the night pen earlier in the day, so that most ticks would detach in this unsuitable environment. This could be applied if herdsmen could leave the night pen much earlier in the morning (before dawn) or if cattle could be left free to graze nightly, which is impossible in areas where pastures are interspersed with unharvested fields. However, from November onwards, cattle are allowed to graze crop residues in harvested fields where they can spend more than 3-4 hours daily (Stachurski, 2000b). Such fields are unsuitable for nymph survival (no shade, no bush and no perennial grasses) and are not grazed in the next rainy season: the great majority of engorged nymphs disseminated there would die. The strategy during the dry season could therefore be to bring cattle into these fields after 14h00 or 15h00 and to let the animals graze community pasture during the first half of the day while, at present, herds are indiscriminately brought in the morning or in the afternoon into the fields. Cattle infestation during the rainy season and consequently acaricide treatments could therefore be reduced by the implementation of this kind of integrated tick control strategy. Such a herd management would not require an important change in current practices since herdsmen are already accustomed to move cattle between savannah and harvested fields (Stachurski, 2000b). However, as most farmers use community pasture, herd movement management would only be effective in reducing tick densities if all the herds sharing the

same pastures could follow the same procedure. The implementation of this type of strategy should therefore be preceded by a local awareness campaign.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to S. Zoungrana, M. Konkobo, I. Dicko, and I. Barry for technical assistance during data collection, and to the farmers who accepted the constraints due to the experimental schedules. The studies were conducted under the supervision of Dr S.M. Touré and Prof. A.S. Gouro, successive general directors of CIRDES. The various versions of the manuscript were improved by Dr Lesley Bell-Sakyi and Dr Pablo Tortosa.

FINANCIAL SUPPORT

These studies were funded by CIRAD.

REFERENCES

- Barré, N.** (1989). Biologie et écologie de la tique *Amblyomma variegatum* (Acarina: Ixodina) en Guadeloupe (Antilles Françaises). *Thèse de Doctorat ès Sciences*, Université de Paris-Sud-Orsay, France, 268 pp.
- Belozerov, V. N.** (1982). Diapause and biological rhythms in ticks. In *Physiology of ticks* (ed. Obenchain, F. D. and Galun, R.), pp. 469-499. Pergamon Press, Oxford, Great Britain.
- Bianchi, M. W. and Barré, N.** (2003). Factors affecting the detachment rhythm of engorged *Boophilus microplus* female ticks (Acari: Ixodidae) from Charolais steers in New Caledonia. *Veterinary Parasitology* **112**, 325-336.
- Diallo, M., de La Rocque, S. and César, J.** (1998). *Évolution des formations ligneuses riveraines dans la zone agro-pastorale de Sidéradougou (Burkina Faso) et recherche des causes anthropiques*. CIRDES/CIRAD, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.
- Dreyer, K., Fourie, L. J., and Kok, D. J.** (1997). Predation of livestock ticks by chickens as a tick control method in a resource-poor urban environment. *Onderstepoort Journal of veterinary Research* **64**, 273-276.
- Hart, B. L.** (1994). Behavioural defense against parasites: interaction with parasite invasiveness. *Parasitology* **109**, 139-151.
- Hassan, S. M., Dipeolu, O. O., Amoo, A. O. and Odhiambo, T. R.** (1991). Predation on livestock ticks by chickens. *Veterinary Parasitology* **38**, 199-204.
- Minshull, J. I.** (1982). Drop-off rhythms of engorged *Rhipicephalus appendiculatus* (Acarina: Ixodidae). *Journal of Parasitology* **68**, 484-489.
- Minshull, J. I. and Norval, R. A. I.** (1982). Factors influencing the spatial distribution of *Rhipicephalus appendiculatus* in Kyle Recreational Park, Zimbabwe. *South African Journal of Wildlife Research* **12**, 118-123.
- Mohammed, A. S., Khitma, H. E. and Hassan, S. M.** (2005). Drop off rhythm and survival periods of *Amblyomma lepidum* (Acari: Ixodidae) under field conditions. *Experimental and Applied Acarology* **36**, 225-232.
- Morel, P.-C.** (1974). Les méthodes de lutte contre les tiques en fonction de leur biologie. *Les Cahiers de Médecine Vétérinaires* **43**, 3-23.

- 15 -

- Norval, R. A. I. and Rechav, Y.** (1979). An assembly pheromone and its perception in the tick *Amblyomma variegatum* (Acarina : Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* **16**, 507-511.
- Norval, R. A. I., Sutherst, R. W., Kurki, J., Gibson, J. D. and Kerr, J. D.** (1988). The effect of the brown ear-tick *Rhipicephalus appendiculatus* on the growth of Sanga and european breed cattle. *Veterinary Parasitology* **30**, 149-164.
- Norval, R. A. I., Sutherst, R. W., Jorgensen, O. G., Gibson, J. D. and Kerr, J. D.** (1989). The effect of the bont tick (*Amblyomma hebraeum*) on the weight gain of Africander steers. *Veterinary Parasitology* **33**, 329-341.
- Petney, T. N., Horak, I. G. and Rechav, Y.** (1987). The ecology of the african vectors of heartwater, with particular reference to *Amblyomma hebraeum* and *A. variegatum*. *Onderstepoort Journal of veterinary Research* **54**, 381-395.
- Rechav, Y.** (1978). Drop-off rhythms of engorged larvae and nymphs of the bont tick, *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae), and the factors that regulate them. *Journal of Medical Entomology* **14**, 677-687.
- Stachurski, F., Musonge, E. N., Achu-Kwi, M. D., Saliki, J. T.** (1993). Impact of natural infestation of *Amblyomma variegatum* on the liveweight gain of male Gudali cattle in Adamawa (Cameroon). *Veterinary Parasitology* **49**, 299-311.
- Stachurski, F.** (2000a). Invasion of West African cattle by the tick *Amblyomma variegatum*. *Medical and Veterinary Entomology* **14**, 391-399.
- Stachurski, F.** (2000b). Modalités de la rencontre entre la stase adulte de la tique *Amblyomma variegatum* (Acari, Ixodida) et les bovins : applications potentielles à la lutte contre ce parasite. *Thèse de Doctorat ès Sciences*, Université de Montpellier II, France, 264 pp.
- Stachurski, F.** (2006). Attachment kinetics of the adult tick *Amblyomma variegatum* to cattle. *Medical and Veterinary Entomology* **20**, 317-324.
- Wilkinson, P. R.** (1970). Factors affecting the distribution and abundance of the cattle tick in Australia: observations and hypotheses. *Acarologia* **XII**, 492-508.

Table 1. Experimental schedule of the study carried out in farm T during a dry season (whole herd involved) and the following rainy season (4 and then 6 zebus involved). Each pasture was grazed by the cattle during the indicated time periods.

		Plot 1	Plot 2	Plot 3	Plot 4	Community pasture
Dry season	Day 1	Morning	Afternoon	-	-	Midday
	Day 2	-	-	-	-	Whole day
	Day 3	-	-	Afternoon	Morning	Midday
	Day 4	-	-	-	-	Whole day
	Day 5	Morning	Afternoon	-	-	Midday
	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.
Morning: 08h30 - 11h30; Midday: 11h30 - 15h00; Afternoon: 15h00 - 18h00						
Rainy season	Day 1	-	Whole day	-	-	
	Day 2	Whole day	-	-	-	Not used
	Day 3	-	-	-	Whole day	by the
	Day 4	-	-	Whole day	-	monitored
	Day 5	-	Whole day	-	-	animals
	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.	
Whole day: 09h15 - 17h30						

Table 2. Number of *Amblyomma variegatum* adults captured during the rainy season by the monitored cattle in farm T during the 9 passages (4 zebus for passage 1-7; 6 zebus for passage 8 and 9); characteristics of the four plots installed. The stars indicate the days during which rainfall occurred in the morning.

		Plot 1	Plot 2	Plot 3	Plot 4
	Period of use during the dry season	Morning	Afternoon	Afternoon	Morning
Characteristics	Size	1.05 ha	1.05 ha	1.5 ha	1.5 ha
	Type of vegetation	Good	Good	Poor	Poor
	Passage 1	61	119	100 *	33
	Passage 2	14 *	110	90	27
	Passage 3	34	85	40	15
	Passage 4	31	77	12 *	2
	Passage 5	20	67	28	15
	Passage 6	17	77	48	8
	Passage 7	6	39	20	10
	Passage 8	17	54	13	12
	Passage 9	16	43	19	16

- 18 -

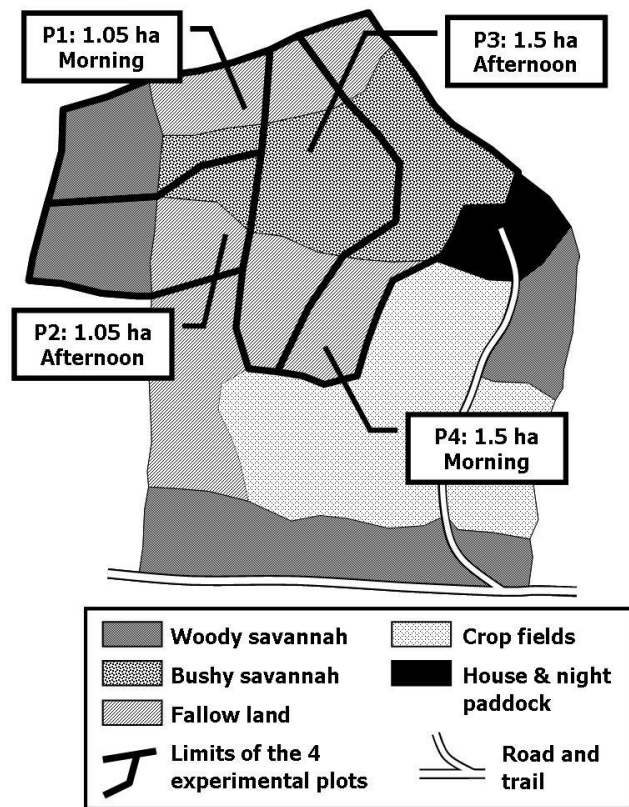


Fig. 1. Map of the farm T where the study scheduled to assess the influence of herd management on *A. variegatum* adult pasture density was implemented “Morning” and “afternoon” refer to the period during which the fenced plots were grazed by the herd during the dry season.

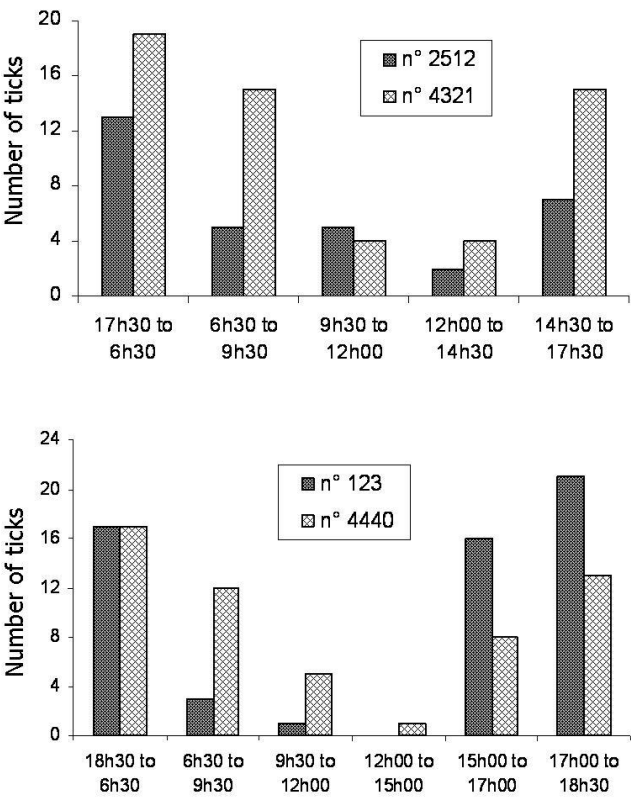


Fig. 2. *Amblyomma variegatum* nymph drop off pattern during the two trials implemented in CIRDES paddock with 4 naturally infested cattle (top: first trial; bottom: second trial).

- 20 -

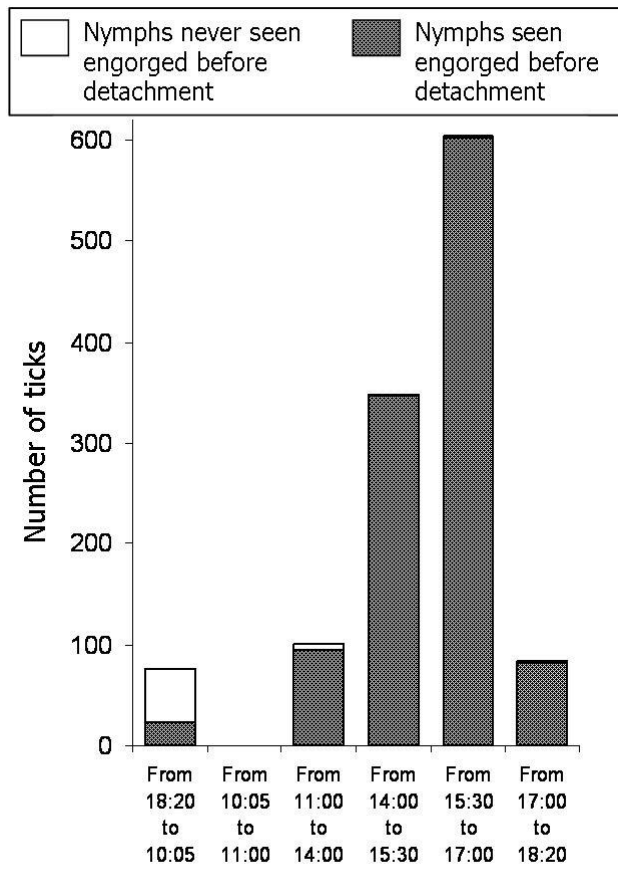


Fig. 3. *Amblyomma variegatum* nymph detachment pattern for the 1,213 ticks monitored during the field trial.

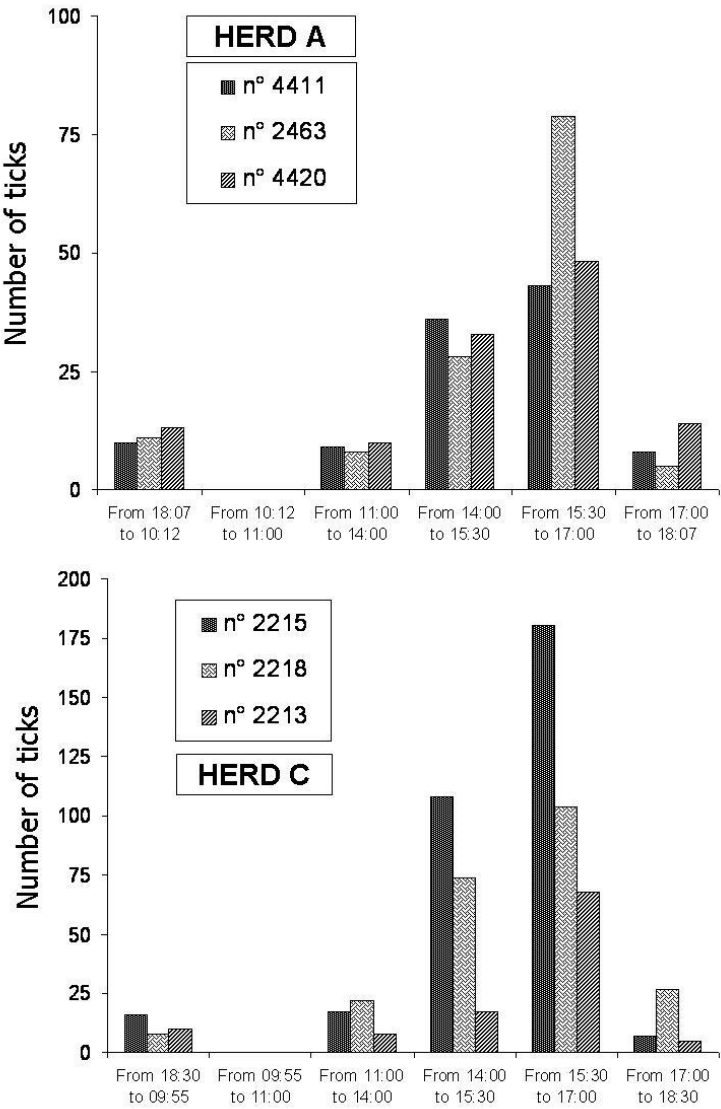


Fig. 4. *Amblyomma variegatum* nymph drop off pattern according to the host for the 6 animals monitored on two occasions. The tick numbers are the total over the 8-day period.

- 22 -

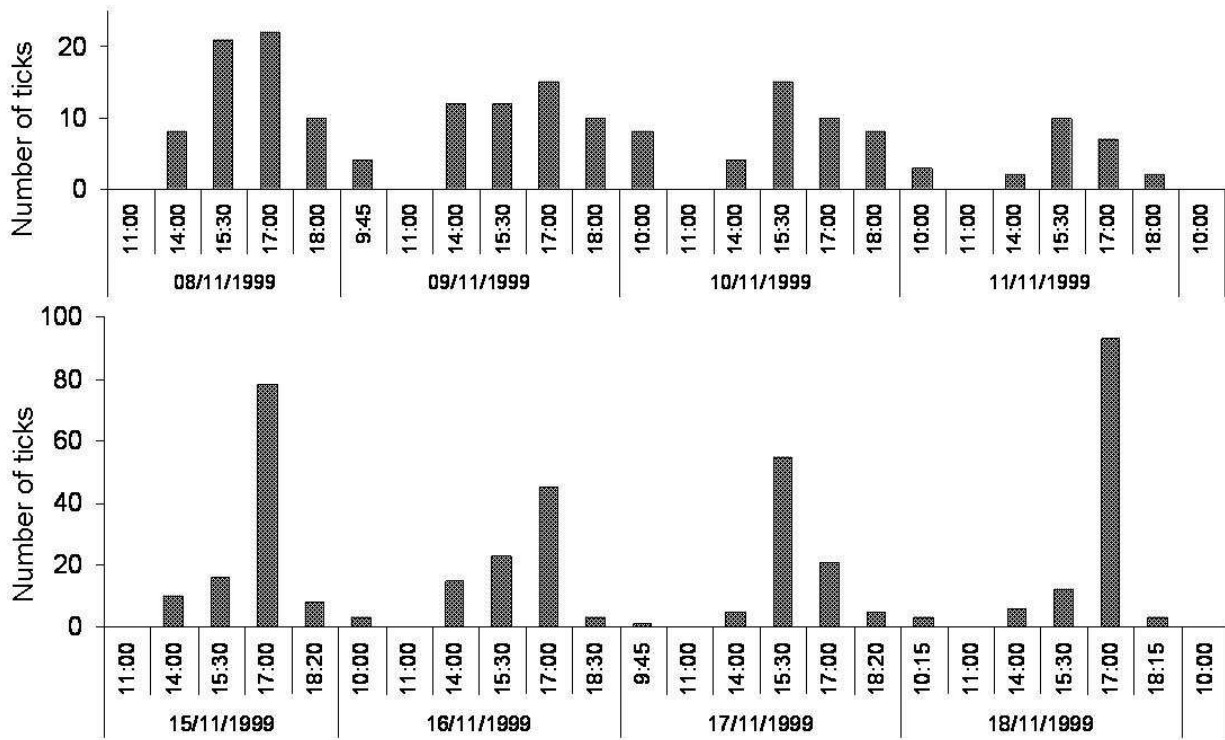


Fig. 5. *Amblyomma variegatum* nymph drop off pattern according to the time period for week 1 (top, herd A) and week 2 (bottom, herd C) of the field trial.

4 Conclusions

L'étude présentée dans cet article portant sur la cinétique de détachement des nymphes gorgées d'*A. variegatum* a révélé une forte hétérogénéité temporelle de la chute de ces tiques, 75% se détachant entre 14 h 30 et 18 h 30. Cette observation permet d'envisager la possibilité de diminuer l'infestation des pâturages par les tiques adultes présentes en saison des pluies, grâce à une gestion raisonnée des déplacements des bovins en saison sèche. Pendant les heures de fort détachement des nymphes, les animaux seraient conduits sur des milieux peu propices à la survie des tiques (champs récoltés, parc de nuit, parcelle au sol nu et tassé...). A l'inverse, ils pâtureraient sur les savanes aux heures pendant lesquelles peu de nymphes se détachent.

Par ailleurs, l'infestation du bétail par les tiques adultes d'*A. variegatum* pendant la saison des pluies a pu être réduite lors d'essais expérimentaux par la mise en oeuvre de cette stratégie intégrée de lutte contre les tiques. Par conséquent, cette méthode réduit la fréquence des traitements acaricides. Une telle gestion de troupeau n'exigerait pas un changement important des pratiques en vigueur puisque les bergers sont déjà accoutumés pour déplacer le bétail entre la savane et les champs moissonnés. Cependant, la surveillance des déplacements des troupeaux ne serait efficace, à réduire la densité des tiques, que si tous les troupeaux partageant les mêmes aires de pâture suivent le même procédé. L'exécution de ce type de stratégie devrait donc être précédée par une campagne de sensibilisation au niveau local.

CHAPITRE 4

Dynamique d'infestation des tiques dans la zone de Békuy

1 Contexte d'étude

La cowdriose est avant tout une maladie vectorielle dont l'agent causal, *E. ruminantium*, est transmis par des tiques du genre *Amblyomma*. Etant une maladie vectorielle, la dynamique de cette pathologie ne concerne pas seulement l'hôte et l'agent pathogène mais également le vecteur qui peut influencer la circulation des souches voire favoriser certains génotypes d'*E. ruminantium* ou affecter préférentiellement certains hôtes. La lutte contre les maladies à transmission vectorielle en général et contre la cowdriose en particulier, passe en partie par le contrôle du vecteur afin de réduire la transmission de l'agent pathogène. Aussi, pour mieux contrôler ces vecteurs, est-il important de connaître leur dynamique d'infestation de l'hôte afin de cibler les périodes efficaces de lutte.

2 Objectifs de l'étude

L'objectif est donc de définir si dans la région d'étude de la structuration des populations d'*E. ruminantium*, des facteurs particuliers liés aux vecteurs ne seraient pas susceptibles d'influencer les dynamiques en jeu. Ce préalable est nécessaire à une analyse approfondie de la diversité génétique d'*E. ruminantium* et de l'épidémiologie moléculaire de la cowdriose.

3 Zone d'étude et plan d'échantillonnage

Le département de Békuy est situé à 70 km au nord-est de Bobo-Dioulasso, seconde grande ville du Burkina Faso et où siège le Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES) (**figure 3**). La population dans ce département compte 14205 habitants qui vivent en majorité de l'agriculture associée à de petits élevages domestiques. On compte ainsi dans ce département 21210 têtes de bovins, 24761 têtes de moutons et 15809 têtes de chèvres élevés sous un système d'élevage traditionnel, extensif : les animaux sont conduits sur les pâturages naturels pendant certaines heures de la journée et reviennent le soir aux parcs de nuit. La complémentation alimentaire des animaux est exceptionnelle sauf pour les vaches laitières. Outre les aléas climatiques qui conditionnent la disponibilité du fourrage, les trypanosomoses et l'infestation par les tiques sont citées comme les principales contraintes au développement de l'élevage dans ce département.

La collecte de tiques a été faite dans les trois villages de Békuy, Sara et Lamba qui sont distants entre eux d'une dizaine de kilomètres (**figure 3**). Dans cette zone, la végétation se compose d'une savane arbustive et d'une forêt boisée, clairsemée par endroits. Le climat est marqué par deux saisons distinctes : une saison des pluies qui va de mi-mai à mi-octobre et une saison sèche de novembre à avril. Les précipitations au cours des cinq dernières années sont en moyenne 880mm.

L'enquête longitudinale a été conduite sur deux années (2007 et 2008). Les séances de collecte des tiques dans les trois villages de Békuy, Lamba et Sara ont été calquées sur les périodes d'activité des adultes d'*A. variegatum* et des nymphes : les adultes étaient récoltés en juin, juillet et août et les nymphes en octobre, novembre et décembre. Vingt-six bovins, 30 moutons et 30 chèvres ont été identifiés dans différents élevages de ces trois villages. Afin d'obtenir une dynamique annuelle de l'infestation des bovins – les petits ruminants n'étant que très peu infestés par les tiques adultes des différentes espèces – la collecte des tiques s'est faite mensuellement dans le village de Békuy à partir d'octobre 2007 jusqu'à la fin du suivi en décembre 2008. Par ailleurs, dans les autres villages, les bovins ont été examinés à 13 reprises, soient 6 fois en 2007 (en juin, juillet, août, octobre, novembre et décembre) et 7 fois en 2008 (de juin à décembre). La récolte sur les ovins a eu lieu à dix occasions en octobre, novembre et décembre en 2007 et de juin à décembre 2008.

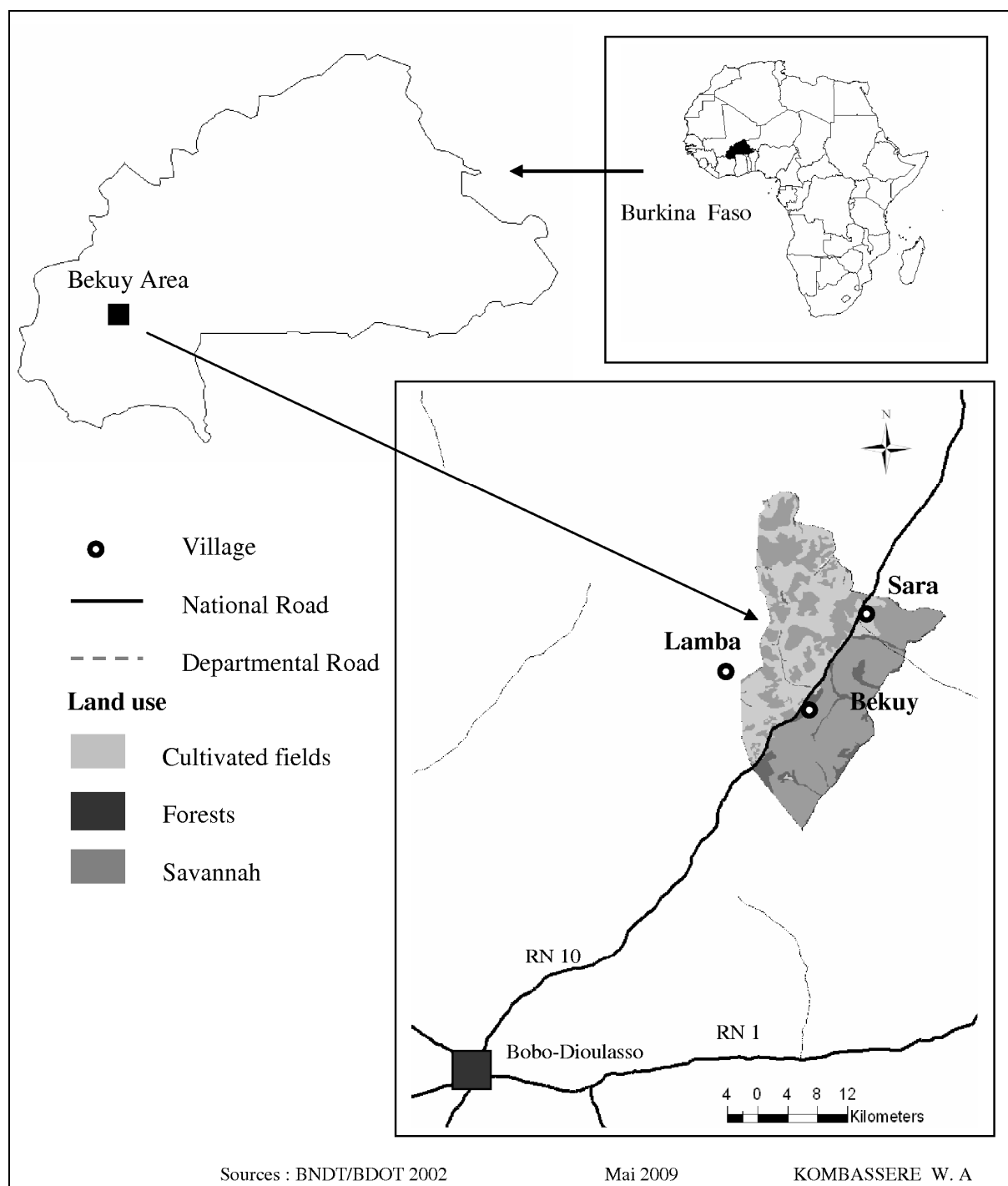


Figure 5 : Localisation des villages de Békuy, Lamba et Sara dans la zone d'étude.

A chaque passage, les animaux identifiés sont examinés et entièrement détiqués à la main et les tiques sont conservées dans de l'éthanol à 70% (**Photo 5**). Aussi, l'identification d'espèce (autre qu'*A. variegatum*) qui s'est faite au CIRDES suivant les clés d'identification

définies par Camicas et al., (1998), n'a-t-elle concerné que les lots de tiques récoltées à Békuy.

Les tiques *A. variegatum* qui sont récoltées dans le but d'effectuer l'analyse moléculaire d'*E. ruminantium*, ont également été toutes conservées dans de l'alcool sauf lorsqu'il s'agissait de nymphes gorgées ayant pris leur repas de sang. Celles-ci sont conservées au CIRDES dans de conditions contrôlées de température (entre 27°C et 29°C) et d'humidité relative (entre 85 et 90%). Elles sont ainsi maintenues jusqu'à la mue en adultes.

Le nombre de tiques récoltées a été enregistré sur un tableur par espèce, par espèce animale et par mois de collecte pour chaque village (Békuy, Lamba et Sara). Les moyennes mensuelles des dénombrements de tiques des trois villages ont été calculées, par espèce par génération de tableaux croisés dynamiques du tableur Excel Office 2007. L'abondance de chaque espèce de tiques a été calculée d'une part par rapport au nombre de tiques récoltées par village et d'autre part par rapport au nombre total de tiques récoltées sur chaque espèce animale. La comparaison entre des moyennes ou entre des proportions a été faite par les tests t et z respectivement ; les différences observées sont significatives lorsque $p < 0,05$.



Photo 10 : Séance de collecte de tiques, l'animal est immobilisé et entièrement détiqué, cliché Adakal, 2007.

4 Evaluation de la prévalence d'*E. ruminantium* chez *A. variegatum*

Au delà de la dynamique d'infestation des espèces de tiques rencontrées et notamment de la dynamique d'*A. variegatum*, vecteur de la cowdriose, une dernière composante devait être précisément établie avant d'aborder l'étude moléculaire de la dynamique d'*E. ruminantium*. Il s'agit de déterminer dans la zone géographique d'étude la prévalence d'*E. ruminantium* au sein de la population d'*A. variegatum* récoltée.

Pour cela, une analyse a été réalisée sur 2192 tiques parmi celles conservées en alcool et parmi les nymphes muées en adultes. Cet échantillon a été choisi au hasard en sélectionnant, chaque fois que le nombre disponible le permettait, 5 tiques par animal, par

période de collecte et par village. La présence d'*E. ruminantium* dans ces tiques a été recherchée par amplification par PCR d'un fragment du gène pCS20 selon une approche de PCR nichée (Mahan *et al.*, 1992; Martinez *et al.*, 2004; Molia *et al.*, 2008; Waghela *et al.*, 1991). Les taux d'infection ont été établis après transformation Arc-Sine des proportions. Toutes les données suivaient une distribution normale (test de normalité de Kolmogorov-Smirnov). La méthode ANOVA a été utilisée pour comparer les données à l'aide du logiciel Statview 5.0.1 software (1998, SAS Institute, Inc., Cary, NC).

5 Résultats

5.1 Abondance des tiques récoltées

Un total de 10.273 tiques adultes a été examiné et les quatre genres suivants, identifiés : *Amblyomma* (4261 soit 41,6%), *Hyalomma* spp (4940 soit 48,3%), *Rhipicephalus* spp (530 soit 5,2%) et *Boophilus* spp (506 soit 4,9%). La répartition par village est telle que 27,8% des tiques ont été collectées à Békuy, 26,2% à Lamba et 46% à Sara. Ces mêmes tiques sont réparties sur les animaux comme suit : seulement 0,5% ont été récoltées sur des chèvres, 3% sur des moutons, et la quasi-totalité, soit 96,5% sur des bovins (**tableaux I et II**). Concernant les nymphes d'*A. variegatum*, qui est le seul genre considéré dans la collecte des nymphes, un échantillon de 1658 tiques fut récolté dont la répartition dans les villages est la suivante : 39,9% des nymphes ont été récoltées à Békuy, 26,8% à Lamba et 33,3% à Sara. La répartition selon l'espèce animale montre que seulement 8,3% des nymphes ont été récoltées sur les chèvres, tandis que 42,5% et 49,2% des nymphes récoltées l'ont été sur respectivement sur les moutons et les bovins (**tableaux III et IV**). Les larves quant à elles, n'ont pas été récoltées.

Tableau I : Distribution globale des tiques adultes (toutes espèces confondues) récoltées au cours des suivis 2007 et 2008 en fonction des villages

Village	<i>Nombre total</i>	<i>Pourcentage (%)</i>
<i>Békuy</i>	2841	27,8
<i>Lamba</i>	2683	26,2
<i>Sara</i>	4713	46,0
Total	10237	100

Tableau II : Distribution globale des tiques adultes (toutes espèces confondues) récoltées au cours des suivis 2007 et 2008 en fonction de l'espèce hôte

Espèce animale	<i>Nombre total</i>	<i>Pourcentage (%)</i>
<i>Chèvre</i>	51	0,5
<i>Mouton</i>	309	3,0
<i>Bovin</i>	9877	96,5
Total	10237	100

Tableau III : Distribution globale des nymphes d'*A. variegatum* récoltées au cours des suivis 2007 et 2008 en fonction des villages

Village	<i>Nombre total</i>	<i>Pourcentage (%)</i>
<i>Békuy</i>	661	39,9
<i>Lamba</i>	445	26,8
<i>Sara</i>	552	33,3
Total	1658	100

Tableau IV : Distribution globale des nymphes d'*A. variegatum* récoltées au cours des suivis 2007 et 2008 en fonction de l'espèce hôte

Espèce animale	<i>Nombre total</i>	<i>Pourcentage (%)</i>
<i>Chèvre</i>	138	8,3
<i>Mouton</i>	704	42,5
<i>Bovin</i>	816	49,2
Total	1658	100

5.2 Evolution mensuelle et saisonnière de l'infestation par les différents genres

***Hyalomma* spp**

Les adultes d'*Hyalomma* spp sont actifs et présents sur les animaux durant toute l'année avec des variations de densités en fonction de la saison (**tableau V**). Sur les deux années de collecte, le pic d'infestation par les tiques *Hyalomma* spp a été observé en juillet en 2007 avec un niveau moyen de $20,3 \pm 17,2$. En 2008, le maximum d'infestation moyenne de $14,1 \pm 28,4$ a été observé en août. Toutefois, l'infestation moyenne de juillet 2008 reste également élevée puisqu'elle est de $12,8 \pm 32,1$. La densité des adultes d'*Hyalomma* spp est fortement liée à la pluviométrie comme en témoigne la forte corrélation positive qui existe entre ces deux paramètres (**figure 2**). Le facteur le plus variable sur les deux années de la collecte a été le volume de précipitations. En 2007 comme en 2008, la saison des pluies s'est étendue d'avril à octobre mais en 2008 les précipitations ont été plus abondantes même si les moyennes observées ne sont pas significativement différentes ($p = 0,093$).

***Rhipicephalus* spp**

Les adultes de *Rhipicephalus* spp ont été trouvés sur les animaux de juin à octobre 2007 et absents de novembre 2007 à juin 2008. On observe là un décalage du début d'activité des ces tiques entre les deux années. Les pics d'infestation sont observés durant le mois de juillet en 2007 ($2,6 \pm 2,6$) et durant le mois d'août en 2008 ($2,1 \pm 4,1$). L'activité de ces tiques semble totalement inféodée à l'arrivée de la saison des pluies car la corrélation dans ce cas aussi est fortement positive (**figure 2**).

***Boophilus* spp**

Les adultes de *Boophilus* spp, à l'instar du genre *Hyalomma*, infestent les animaux tout au long de l'année. Le niveau d'infestation moyenne par animal reste relativement faible, mais on observe des pics d'infestation à des périodes précises de l'année (**tableau V**). Ainsi, durant l'année 2008, deux pics ont été observés en avril et en octobre. La connaissance de ces périodes de pics est importante lorsqu'on met en place des suivis de collecte, surtout dans le cadre de l'étude de la résistance aux acaricides. En effet, pour réaliser les tests toxicologiques,

on récolte généralement des femelles gorgées dont la cinétique de gorgement est également fonction du rythme circadien.

Adultes d'*A. variegatum*

Les adultes d'*A. variegatum* ont été trouvés sur les animaux du début des collectes (en juin 2007) – car faut-il le rappeler, les périodes de récolte ont été choisies en fonction de l'activité d'*A. variegatum* – à novembre 2007 puis d'avril à décembre 2008. Sur la période du suivi, les adultes d'*A. variegatum* ont été absents de décembre 2007 à mars 2008 (**tableau V**). Les pics d'infestation ont été observés durant le mois de juillet pour les deux années avec une infestation moyenne plus importante en 2007 (**figure 6**).

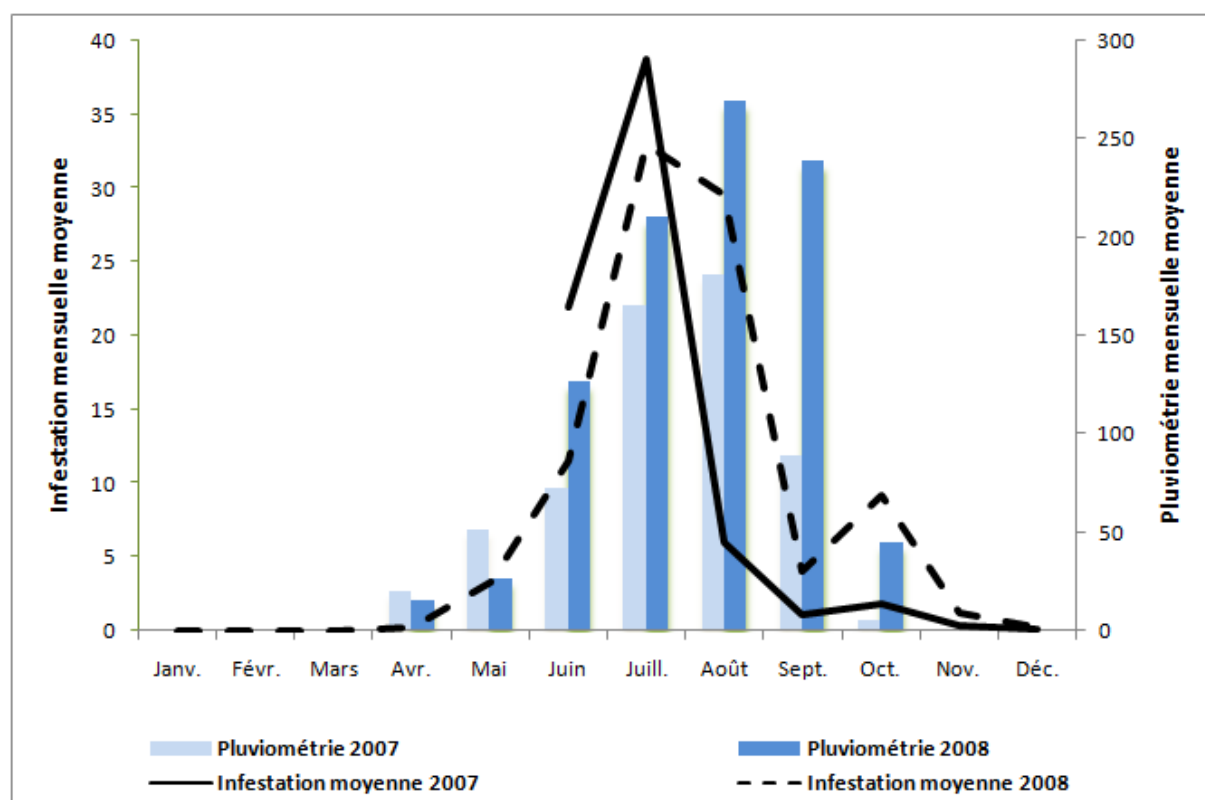


Figure 6 : Evolution de l'infestation par les adultes d'*A. variegatum* des troupeaux suivis dans les trois villages en 2007 et 2008.

Nymphes d'*Amblyomma variegatum*

Quant aux nymphes, elles ont été présentes sur les animaux tout au long du suivi sauf durant deux mois de chacune des années : en juillet-août 2007 puis en août-septembre 2008. De par les données récoltées, il semble que le pic d'infestation par les nymphes serait observé pendant le mois de janvier (**tableau V**). C'est le cas en janvier 2008, mais comme les essais se sont arrêtés en décembre 2008, il est impossible de comparer les données sur les deux années. Toutefois, nous pouvons supposer que l'augmentation du niveau d'infestation observée en décembre 2008 ira crescendo pour atteindre son maximum en janvier 2009.

5.3 Variation du niveau d'infestation selon les villages et les espèces animales

Les données présentées dans les **tableaux II et III** concernent l'infestation globale de tous les animaux (toutes espèces confondues) pour l'ensemble des trois villages. La proportion d'adultes *A. variegatum* par rapport aux autres genres et pour chaque village est significativement plus importante à Békuy qu'à Lamba et la proportion observée à Lamba, plus importante que celle observée à Sara. Inversement, la proportion des tiques *Hyalomma* spp par rapport aux autres genres est significativement plus importante à Sara qu'à Lamba et celle à Lamba plus importante que celle observée à Békuy. Par contre, pour les deux autres genres, *Rhipicephalus* spp et *Boophilus* spp, leurs proportions sont statistiquement comparables à Lamba et à Sara mais plus importantes à Békuy.

Pour ce qui est de l'infestation par espèce animale examinée, la proportion des adultes *A. variegatum* par rapport aux autres genres récoltés chez les chèvres, est comparable à la proportion observée chez les bovins. Elle est statistiquement différente et plus faible chez les moutons. La proportion des adultes de *Boophilus* spp, qui ne représentent qu'entre 0,3-5% de la collecte totale selon l'espèce animale, est statistiquement comparable entre les trois villages. La même tendance est observée pour le genre *Hyalomma* spp. Quant au genre *Rhipicephalus* spp, sa proportion sur les chèvres est comparable à celle obtenue sur les moutons, mais statistiquement différente à celle observée sur les bovins. *Rhipicephalus* spp constitue chez les bovins, le genre le moins représenté.

Tableau V : Evolution moyenne de l'infestation par les tiques récoltées dans les troupeaux des trois villages suivis en 2007 et 2008 (tout hôte animal considéré)

Mois	<i>A. variegatum</i> adultes	<i>A. variegatum</i> nymphe	<i>Hyalomma</i> spp	<i>Rhipicephalus</i> spp	<i>Boophilus</i> spp
juin-07	21,7 ± 11	0,1 ± 0,3	6,1 ± 11	0,1 ± 0,3	0,04 ± 0,2
juil.-07	38,7 ± 33	0,0	20,3 ± 17,2	2,6 ± 2,6	0,2 ± 0,6
août-07	5,9 ± 6	0,0	5,2 ± 5,4	0,7 ± 1,4	0,2 ± 0,5
oct.-07	0,7 ± 2	1,5 ± 1,9	1,5 ± 3,2	0,2 ± 0,6	0,9 ± 2,4
nov.-07	0,1 ± 0,4	2,9 ± 3,9	0,7 ± 1,6	0,0	1,1 ± 2,6
déc.-07	0,0	0,9 ± 1,7	0,4 ± 1,1	0,0	0,4 ± 1,2
janv.-08	0,0	7,6 ± 6	5,0 ± 10,3	0,0	2,5 ± 2,6
févr.-08	0,0	2,4 ± 1,7	1,9 ± 3,9	0,0	3,1 ± 2,5
mars-08	0,0	1,5 ± 1,3	2,6 ± 5,3	0,0	2,8 ± 2,7
avr.-08	0,3 ± 1	1,8 ± 1,5	0,2 ± 0,8	0,0	4,4 ± 2,7
mai-08	3,3 ± 6	1 ± 0,7	1,2 ± 2,3	0,0	0,9 ± 0,8
juin-08	3,5 ± 7	0,6 ± 2,2	3,2 ± 8,4	0,0	0,1 ± 0,4
juil.-08	10,2 ± 22	0,01 ± 0,1	12,8 ± 32,1	1,2 ± 2,3	0,02 ± 0,2
août-08	9,1 ± 20	0,0	14,1 ± 28,4	2,1 ± 4,1	0,01 ± 0,1
sept.-08	1,3 ± 3	0,0	8,0 ± 17,1	0,8 ± 1,7	0,2 ± 0,6
oct.-08	2,8 ± 9	1,6 ± 3	2,5 ± 4,4	0,6 ± 2,1	5,8 ± 12,8
nov.-08	0,4 ± 1	5,7 ± 7,5	0,9 ± 2,3	0,01 ± 0,1	0,9 ± 2,9
déc.-08	0,1 ± 0,3	6,0 ± 7,8	0,9 ± 3,4	0,0	1 ± 2,9

Tableau VI : Proportions des tiques adultes des différents genres identifiés en fonction des villages

Village	<i>A. variegatum</i>	<i>Hyalomma spp</i>	<i>Rhipicephalus spp</i>	<i>Boophilus spp</i>
Bekuy	1104/555 (58) ^a	264/556 (29) ^a	65/121 (7) ^a	176 (6) ^a
Lamba	833/312 (43) ^b	481/795 (48) ^b	56/70 (5) ^b	136 (5) ^b
Sara	892/565 (31) ^c	1207/1637 (60) ^c	97/121 (5) ^b	194 (4) ^b
Total	2829/1432	1952/2988	218/312	506

Les valeurs *x* et *y* dans l'écriture *x/y* représentent respectivement, le nombre total de tiques mâles/le nombre total de tiques femelles pour chaque espèce considérée. Les proportions de la même colonne (valeurs entre parenthèses), suivies de lettres différentes, sont significativement différentes au seuil de 5 %.

Tableau VII : Proportions des tiques adultes des différents genres identifiés en fonction de l'animal hôte

Espèce animale	<i>A. variegatum</i>	<i>Hyalomma spp</i>	<i>Rhipicephalus spp</i>	<i>Boophilus spp</i>
Chèvre	7/4 (22) ^a	9/6 (29) ^a	7/17 (47) ^a	1 (2) ^a
Mouton	34/6 (13) ^{a,b}	40/85 (40) ^a	76/67 (46) ^a	1 (0,3) ^a
Bovin	2788/1422 (43) ^a	1903/2897 (49) ^a	135/228 (4) ^b	504 (5) ^a
Total	2829/1432	1952/2988	218/312	506

Les valeurs *x* et *y* dans l'écriture *x/y* représentent respectivement, le nombre total de tiques mâles/le nombre total de tiques femelles pour chaque espèce considérée. Les proportions de la même colonne (valeurs entre parenthèses), suivies de lettres différentes, sont significativement différentes au seuil de 5 %.

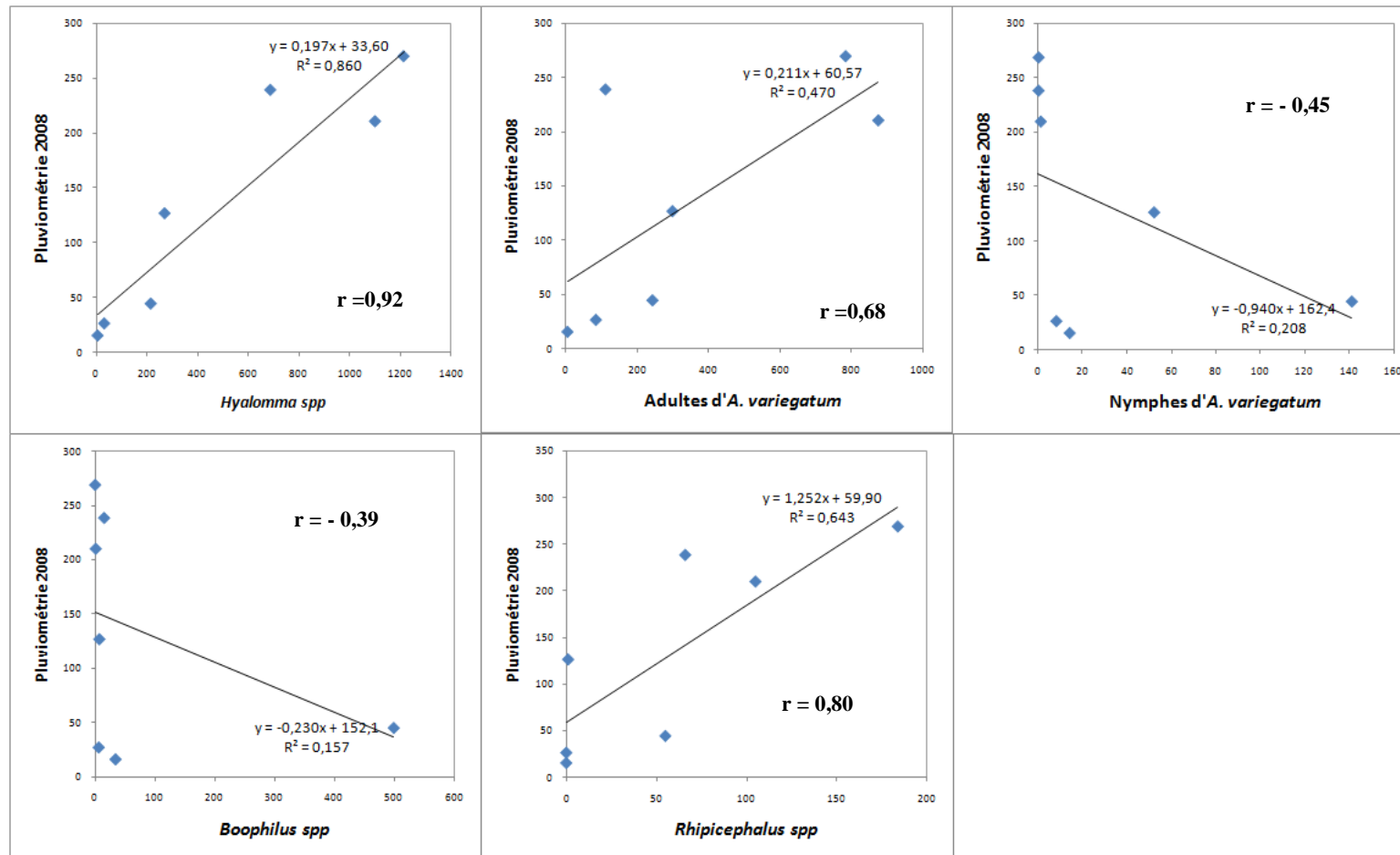


Figure 7 : Relation entre le nombre de tiques des différents genres et la pluviométrie (R^2 = coefficient de détermination ; r = coefficient de corrélation)

5.4 Suivi longitudinal dans le village de Bekuy

Parmi les tiques récoltées à Bekuy, seules les tiques adultes ont été examinées pour l'identification d'espèce. Un total de 2786 tiques identifiées ont pu être classées en sept espèces avec les proportions suivantes : *Amblyomma variegatum* (57.93%), *Hyalomma marginatum rufipes* (8.04%), *Hyalomma nitidum* (8%), *Boophilus geigyi* (6.32%), *Hyalomma impeltatum* (4.34%), *Rhipicephalus lunulatus* (2.12%) et *Hyalomma truncatum* (1.87%). Une part importante des tiques *Hyalomma* spp et *Rhipicephalus* spp soit 11,38%, n'a pu être identifiée du fait de l'état des tiques, endommagées au moment du prélèvement (**tableau VIII**).

Tableau VIII : Différentes espèces de tiques identifiées et leurs proportions dans l'échantillon

Espèce tique	Nombre total	Pourcentage (%)
<i>Amblyomma variegatum</i>	1614	57.93
<i>Hyalomma marginatum rufipes</i>	224	8.04
<i>Hyalomma nitidum</i>	223	8.00
<i>Boophilus geigyi</i>	176	6.32
<i>Hyalomma impeltatum</i>	121	4.34
<i>Rhipicephalus lunulatus</i>	59	2.12
<i>Hyalomma truncatum</i>	52	1.87
<i>Hyalomma</i> spp	219	7.86
<i>Rhipicephalus</i> spp	98	3.52
Total	2786	100.00

5.5 Prévalence d'*E. ruminantium* chez *A. variegatum*

Les **tableaux IX** et **X** résument les taux d'infection des tiques par *E. ruminantium*. La prévalence est de 4,7% à Bekuy (35/750), de 3,9% à Lamba (27/699) et de 2,4% à Sara (18/743) avec un taux global d'infection de 3,65% (80/2192). Aucune variation significative n'a pu être observée dans les taux d'infection sur la base de l'espèce hôte. Ces taux étaient de 2,8% (45/1629) chez les tiques récoltées sur bovins, 2,5% (3/118) chez les tiques récoltées sur caprins et 7,2% (32/445) chez les tiques récoltées sur ovins. Du point de vue du stade de développement des tiques, aucune variation statistiquement significative n'a pu être observée non plus. Les prévalences observées étaient respectivement de 3,02%, 4,38% et 3,27% chez les tiques femelles, les mâles et les nymphes.

Tableau IX : Prévalence en pourcentage (%) d'*Ehrlichia ruminantium* en fonction de la stase d'*A. variegatum* et en fonction des villages

	<i>Békuy</i>		<i>Lamba</i>		<i>Sara</i>		
<i>PCR pCS20</i>	<i>négatif (%)</i>	<i>positif (%)</i>	<i>négatif (%)</i>	<i>positif (%)</i>	<i>négatif (%)</i>	<i>positif (%)</i>	<i>Prévalence moyenne / Stase tique +/- (%)</i>
<i>Femelles</i>	148 (95,48)	7 (4,52)	117 (98,32)	2 (1,68)	152 (97,44)	4 (2,56)	417 / 13 (3,02)
<i>Mâles</i>	294 (95,77)	13 (4,23)	275 (94,38)	15 (5,17)	239 (96,37)	9 (3,63)	808 / 37 (4,38)
<i>Nymphes</i>	273 (94,79)	15 (5,21)	280 (96,55)	10 (3,45)	334 (98,53)	5 (1,47)	887 / 30 (3,27)
<i>Prévalence moyenne / Village +/- (%)</i>	715 / 35 (4,67)		672 / 27 (3,86)		725 / 18 (2,42)		2112 / 80 (3,65)

Tableau X : Prévalence en pourcentage (%) d'*Ehrlichia ruminantium* en fonction de la stase d'*A. variegatum* et en fonction de l'animal hôte.

	<i>Bovins</i>		<i>Chèvres</i>		<i>Moutons</i>		
<i>PCR pCS20</i>	<i>négatif (%)</i>	<i>positif (%)</i>	<i>négatif (%)</i>	<i>positif (%)</i>	<i>négatif (%)</i>	<i>positif (%)</i>	<i>Prévalence moyenne / Stase tique +/- (%)</i>
<i>Femelles</i>	402 (98,29)	7 (1,71)	1 (50)	1 (50)	14 (73,68)	5 (26,32)	417 / 13 (3,02)
<i>Mâles</i>	778 (96,29)	30 (3,71)	3 (100)	0 (0)	27 (79,41)	7 (20,59)	808 / 37 (4,38)
<i>Nymphes</i>	404 (98,06)	8 (1,94)	111 (98,23)	2 (1,77)	372 (94,90)	20 (5,10)	887 / 30 (3,27)
<i>Prévalence moyenne/Animal hôte +/- (%)</i>	1584 / 45 (2,76)		115 / 3 (2,54)		413 / 32 (7,19)		2112 / 80 (3,65)

6 Discussion

La dynamique des tiques adultes chez les bovins – qui sont les plus représentatifs de l’infestation, les petits ruminants étant très peu infestés par les tiques adultes – sur les deux années peut être schématisée ainsi : en 2007, la majorité des tiques s’est mise en activité de manière collective dès les premières pluies donnant une moyenne d’infestation par animal de $38,7 \pm 33$ au mois de juillet. Le « réveil » synchrone des tiques épuise plus rapidement le stock présent sur le terrain et fait qu’en décembre 2007, aucune tique adulte n’est trouvée sur les animaux. En 2008, le « réveil » des tiques ne s’est pas fait de manière synchrone, mais plutôt progressivement. Le pic est également atteint en juillet avec une infestation maximale de $33,04 \pm 29,5$ mais l’épuisement se fait moins rapidement. Ces différences observées sont à considérer avec beaucoup de précaution dans leur interprétation car de telles fortes variations d’infestation étaient déjà observées au Burkina Faso (Stachurski, 2000b). En effet, il a été constaté que lorsque l’on sépare deux séries de comptages, commençant à une semaine d’intervalle, on obtient des courbes d’infestation inégales en ce qui concerne le nombre total de tiques observées au cours de la période et le nombre total de tiques infestantes. L’une des hypothèses pouvant expliquer ces variations serait la densité de tiques différente en fonction des milieux fréquentés par les troupeaux qui pâturent alternativement entre la savane et les résidus de récolte. En effet, les animaux dans les trois villages ne pâturent pas forcément sur le même type de végétation. A Békuy et à Sara, il nous a été rapporté que les animaux fréquentent souvent les zones de forêts en période hivernale lorsque les sols cultivables sont occupés par des cultures que les éleveurs et leurs troupeaux n’ont pas le droit d’approcher pour éviter les dégâts aux cultures. Cette situation peut expliquer les fortes prévalences d’*A. variegatum* et de *Hyalomma spp* observées respectivement à Békuy et à Sara.

Un autre facteur capital est l’application de produits acaricides aux animaux par les éleveurs. En effet, il est presque impossible de contrôler ces traitements car les animaux sont la propriété des éleveurs qui en disposent à leur guise. Malgré les précautions prises au début des essais (identification des animaux à suivre, demande de ne pas traiter ces animaux qui, en cas de fortes infestations pouvant être préjudiciables à l’animal, peuvent être traités localement, traitement qui doit être signalé, distribution de médicaments vétérinaires pour motiver les éleveurs à collaborer), nous ne pouvons donner de garantie que les animaux n’aient pas été traités la veille d’une séance de collecte. Ces considérations, qui n’épuisent

nullement le nombre de raisons expliquant les variations observées, obligent à relativiser grandement les différences interannuelles que l'on peut observer sur le terrain. Les données de chaque suivi doivent être donc considérées dans leurs contextes spatio-temporels ; le plus important étant peut-être de connaître à l'instant t, l'abondance des tiques présentes mais surtout les espèces en cause et les pertes qu'elles peuvent engendrer.

D'autres travaux sur l'évolution saisonnière des espèces de tiques infestant le bétail domestique ont été réalisés dans différents pays de l'Afrique de l'Ouest. Ces études montrent toutes une prédominance d'*A. variegatum* et l'importance que revêt la cowdriose dans la sous-région, la distribution de la maladie étant liée à celle du vecteur. Déjà en 1998, Kaboré et al, montrent au Burkina Faso cette prédominance d'*A. variegatum* vis-à-vis de *Hyalomma marginatum rufipes*, les deux seules espèces qu'ils identifièrent dans leur récolte. Cette prédominance d'*A. variegatum* est confirmée par Koney et al, (1994) au Ghana, Guèye et al (1990) au Sénégal, Farougou et al (2006) au Bénin. En Guinée et en Gambie par contre, c'est le genre *Boophilus spp* qui a été rapporté comme le plus abondant (Mattioli et al., 1997; Tomassone et al., 2004).

Quant au nombre d'espèces identifiées, il est très variable selon les études. Malgré un suivi réalisé sur 12 mois, Kaboré et al, (1998) ne mettent en évidence dans 3 villages du Centre du Burkina Faso que deux espèces, *A. variegatum* et *Hyalomma marginatum rufipes*. Un suivi récent et ponctuel, car les collectes n'ont eu lieu que lors d'un seul passage, réalisé dans des élevages laitiers de la zone périurbaine de Bobo-Dioulasso rapporte la présence des espèces suivantes : *Boophilus annulatus*, *Boophilus geigy*, *Boophilus decoloratus*, *Hyalomma marginatum rufipes*, *Hyalomma truncatum* et *Amblyomma variegatum* (Grindatto et al., 2008). Dans notre étude, nous avons identifié en plus de celle décrites par cette étude, deux autres espèces d'*Hyalomma* : *H. impeltatum* et *H. nitidum* et une espèce de *Rhipicephalus*, *R. lunulatus*. Par contre, nous n'avons pas mis en évidence de *Boophilus annulatus* et *B. decoloratus*. L'identification des espèces de *Boophilus* se base sur la diagnose des mâles qui, de par leur taille très petite, ne sont pas systématiquement récupérés lors de la récolte. En l'absence des mâles, l'identification se fait par dénombrement des rangées de denticules du rostre de femelles. Or, cette partie est généralement endommagée lors du prélèvement, qui se fait par arrachage des tiques car des précautions ne sont pas systématiquement prises. Lors de nos suivis, nous mettions à contribution les éleveurs pour le détiquage complet des animaux, mais faut-il le préciser, la récolte avait pour but prioritaire la récolte du maximum de tiques *A.*

variegatum pour l'étude de caractérisation d'*E. ruminantium*. Aussi, nous n'exigions pas des éleveurs d'être méticuleux dans l'arrache manuel des tiques. Par ailleurs, l'utilisation de matériel d'observation microscopique performant contribuerait à une meilleure identification et réduirait le nombre de tiques non identifiées qui est relativement important dans notre étude (*Hyalomma* spp et *Rhipicephalus* spp représentant 11,38% des tiques à identifier).

Le fait important à souligner est que *Boophilus microplus* n'a pas été identifiée parmi les tiques récoltées dans cette zone de Békuy. Le risque de voir cette tique coloniser la zone sud-ouest du Burkina Faso est grand car des échanges commerciaux de bétails sur pied sont fréquents avec la Côte d'Ivoire où les premiers spécimens de la tique ont été trouvés (Madder *et al.*, 2007). De plus, une des destinations privilégiées des éleveurs transhumants de l'ouest du Burkina est la Côte d'Ivoire.

Nous avons tenté de rechercher les agents pathogènes que pourraient héberger les différentes espèces que nous avons identifiées. Pour ce faire, une centaine de tiques (tous genres confondus) a été envoyée à des collègues américains (Ross University), mais au moment où nous rédigeons ces lignes, aucun résultat n'est encore disponible. En revanche, l'étude réalisée par Grindatto *et al.*, a mis en évidence la présence de *Theileria mutans* et *T. velifera* chez des tiques *Boophilus* et *A. variegatum*. *Anaplasma marginale* a été trouvée sur une tique *B. geigy*. De plus, une enquête menée en 1992 sur les hémoparasitoses transmises par les tiques a révélé la présence de *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale* et *Theileria* sp dans des prévalences variant de 8,3 à 47,9 % chez les vecteurs *Amblyomma*, *Boophilus* et *Rhipicephalus* (Pangui et Salifou, 1992). Ceci témoigne de l'importance du diagnostic des autres hémoparasitoses transmises par les tiques (babéioses et anaplasmoses) pour lesquelles il est admis, nous estimons à tort, qu'il existe une stabilité enzootique sur le terrain. La présence d'un bon vecteur de ces maladies tel que *Boophilus microplus*, compliquerait le tableau.

Au moment de la mise en place du plan d'échantillonnage des tiques qui devaient servir à l'analyse de la structuration des populations d'*E. ruminantium* dans la zone de Békuy, la prévalence attendue était de 10%. Ce taux a été choisi en se basant sur des données précédemment obtenues de l'analyse de tiques adultes, récoltées au stade nymphes gorgées dans neuf régions du Burkina Faso (Adakal, 2004). La prévalence obtenue alors était de 9% avec des extrêmes variant entre 0% et 20%. De plus, habituellement au CIRDES, nous

utilisons 12 à 15 tiques adultes sauvages pour obtenir des infections expérimentales chez des moutons sensibles. Pour toutes ces raisons, nous avons espéré obtenir au moins 10 tiques positives par lot de 100 tiques analysées. Les prévalences obtenues, tous paramètres considérés, sont en deçà des prévisions. Du reste, elles sont inférieures à la plupart des prévalences rapportées dans des études antérieures conduites ailleurs : au Bénin, Farougou *et al.* (1998) ont trouvé une prévalence globale de 8% tandis qu'au Zimbabwe et en Zambie, des prévalences variant entre 6,25% et 39,3% chez les mâles et entre 2,1% et 14,3% chez les femelles ont été obtenues par Peter *et al.*, (2000) en utilisant une PCR pCS20 classique (AB128/129). En Gambie, Faburay *et al.* (2007b) obtiennent une prévalence de 16,6% sur un échantillon de 145 tiques analysées, en utilisant, comme dans notre étude, une PCR nichée pCS20. La faible prévalence d'*E. ruminantium* observée pourrait s'expliquer par une meilleure connaissance de la maladie par les éleveurs de la zone de Békuy avec qui le CIRDES collabore depuis une dizaine d'années. Ces éleveurs connaissent très bien la manifestation de la cowdriose et la période de l'année au cours de laquelle les cas de maladie apparaissent chez leurs animaux. Il n'est pas alors rare de les voir conduire leurs animaux au pâturage avec un flacon d'Oxytétracycline à portée de main. Tous les animaux présentant subitement des signes de fatigue et de nonchalance, sont alors systématiquement traités. Ce comportement pourrait expliquer que les cas de cowdriose-maladie se seraient réduits dans les élevages (puisque ce sont les mêmes que nous suivons depuis ces dix ans de collaboration), ce qui diminuerait la transmission et la circulation de l'agent pathogène entre l'hôte et le vecteur et pourrait expliquer la faible prévalence observée.

7 Conclusion

La conclusion de ce travail sur les dynamiques d'infestation des tiques dans la zone de Békuy est qu'aucun trait particulier ne semble pouvoir être une source d'interférence significative avec la dynamique des souches et populations d'*E. ruminantium* et donc de biais dans l'analyse de la diversité génétique de ces souches. Il est donc possible à ce stade de conclure que dans la zone d'étude délimitée précédemment, il est très peu probable qu'un élément lié à la dynamique des tiques ne vienne biaiser l'étude de diversité génétique et de profil évolutif et que le plan d'échantillonnage tel que précisément établi, permettra une analyse pertinente des données moléculaires.

TROISIEME PARTIE

Analyse de la diversité génétique d'*E. ruminantium* : Structure et profils évolutifs des populations du Burkina Faso

CHAPITRE 5

Sous-chapitre 1 : Développement et validation d'un schéma MLST pour *E. ruminantium*

1 Contexte d'étude

Les éléments préalables décrits dans les chapitres précédents et un plan d'échantillonnage précis ayant été élaboré, il est désormais possible d'aborder la dernière partie du travail de thèse, à savoir déterminer la structure des populations d'*E. ruminantium*. Les données de la littérature comme les résultats rapportés dans le **chapitre 1** ont montré qu'il existe une grande variabilité d'une souche à l'autre et d'un site à l'autre du point de vue de la protection. Cette variabilité phénotypique se doit évidemment d'être soutenue par une variabilité génotypique.

2 Objectifs de l'étude

La question qui se pose par conséquent à ce niveau est de développer une approche moléculaire qui réponde à plusieurs critères importants. Il faut en premier lieu aboutir à un génotypage très précis permettant de révéler la diversité attendue. Il faut également une approche d'analyse de la diversité génétique qui soit neutre du point de vue de la pathogénie ou de l'interaction avec l'hôte, en d'autres termes un marqueur qui ne soit pas soumis à la sélection positive. Enfin, il est aussi nécessaire de disposer de séquences d'ADN fiables, afin de pouvoir aborder le sujet sous l'angle de l'analyse statistique des tendances évolutives. Il faut également, d'un point de vue purement technique, une méthode compatible avec la faible quantité de matériel biologique disponible.

L'approche méthodologique qui semble la plus adaptée et capable de répondre à tous ces critères est la méthode MLST : Multiple Locus Sequence Typing. Etant techniquement une méthode PCR, elle est compatible avec une faible quantité initiale de matériel ADN. Les gènes cibles étant des gènes de fonction centrale, c'est à dire *a priori* sous pression de sélection purificatrice, ou négative, ils ne sont pas en principe soumis à une sélection liée à l'hôte. Le génotypage multilocus étant très précis, il permet de discriminer des souches très proches les unes des autres mais aussi de mettre en évidence la présence de doublons et de biais dans l'échantillonnage. Finalement, la méthode étant basée sur des alignements de séquences, il est possible d'utiliser ces séquences non plus seulement pour du typage mais aussi pour analyser le polymorphisme de l'ADN et les tendances évolutives.

3 Développement et validation d'un schéma MLST pour *E. ruminantium*

Aucune étude MLST complète n'existait avant ce travail de thèse à l'exception d'un essai limité réalisé par Allsopp et Allsopp (2007). Il fallait donc en premier lieu développer un schéma MLST complet et le valider. La première étape à réaliser est d'identifier un nombre suffisamment important de loci à tester pour pouvoir, en cas de problème, disposer d'assez de gènes cibles pour conduire l'analyse. Cette sélection s'est basée à la fois sur l'analyse génomique comparée des souches séquencées d'*E. ruminantium* (Collins *et al.*, 2005; Frutos *et al.*, 2006) et sur l'utilisation de gènes présents chez *E. ruminantium* ou d'autres bactéries pour lesquels des schémas MLST ont été déjà validés (Allsopp *et al.*, 2003; Allsopp and Allsopp, 2007; Harbottle *et al.*, 2006; Inokuma *et al.*, 2001; McCombie *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2006).

4 Identification des gènes cibles

Un ensemble initial de 10 gènes a été retenu pour l'analyse MLST : *adk*, *dnaN*, *gltA*, *groEl*, *lepA*, *lipA*, *lipB*, *secY*, *sodB* et *sucA*. L'approche retenue n'ayant pas pour seul objet le génotypage mais aussi l'analyse de la phylogénie et des tendances évolutives, un jeu

supplémentaire de gènes cibles a été sélectionné dans un but d'analyse comparative. Ces gènes ne sont pas des gènes de fonction centrale et de ménage et, sur la base de l'analyse génomique comparative réalisée précédemment sur trois génomes entiers (Frutos *et al.*, 2006, 2007), ces gènes seraient soumis à des pressions de sélection *a priori* divergentes et qui se rangent en 3 catégories :

a) des gènes *a priori* sous pression de sélection négative, c'est à dire avec un biais vers la conservation et pour lesquels le nombre de substitutions synonymes est significativement (test de Fisher Exact) trop élevé par rapport à ce qui est attendu du seul fait du hasard. Ces gènes sont : *map1*, *map1-13* et *clpB*.

b) des gènes *a priori* sous pression positive, c'est à dire avec un biais vers la non-conservation et pour lesquels le nombre de substitutions non-synonymes est significativement (test de Fisher Exact) trop élevé par rapport à ce qui est attendu du seul fait du hasard. Ces gènes, de fonction inconnue, sont ERGA_CDS_00630, ERGA_CDS_05750 et ERGA_CDS_08580. Il faut préciser que les deux premiers sont des pseudogènes (Frutos *et al.*, 2006).

c) Un gène sans pression de sélection significative, le test de Fisher Exact n'ayant pas montré de biais significatif dans un sens ou l'autre. Ce gène est *cpg1*.

L'évaluation de cet ensemble de gènes cibles a conduit pour diverses raisons techniques liées à des problèmes d'amplification ou de trop grande variabilité, à une liste plus restreinte de gènes cibles qui ont été utilisés pour le développement de l'approche MLST. Les gènes cibles retenus pour analyse MLST sont : *gltA*, *groEl*, *lepA*, *lipA*, *lipB*, *secY*, *sodB* et *sucA*. Trois gènes complémentaires ont au final été retenus, deux gènes à sélection *a priori* négative : *map1* et *clpB* et un gène à sélection *a priori* positive : ERGA_CDS_8580. La répartition de ces gènes sur le génome d'*E. ruminantium* souche Gardel est montrée sur la **figure 6** et les caractéristiques des gènes cibles ainsi que les amorces utilisées pour l'analyse sont résumés dans le **tableau XI**.

5 Vérification de l'identité des souches analysées

Une dernière étape essentielle pour le développement et la validation d'un schéma MLST chez *E. ruminantium* est de vérifier si les souches bactériennes isolées à partir des tiques collectées étaient bien des souches d'*E. ruminantium*. Cette validation a été réalisée selon une triple approche. La première approche a été l'utilisation d'une PCR nichée spécifique pCS20 qui amplifie sélectivement *E. ruminantium* (Waghela *et al.*, 1991; Mahan *et al.*, 1992; Peter *et al.*, 1995; Mahan *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 2004).

Seulement les souches positives à ce test ont été retenues pour l'analyse MLST mais avec au préalable deux autres étapes de confirmation par comparaison de deux gènes avec les gènes orthologues de deux espèces voisines d'*E. ruminantium* : *Ehrlichia chaffeensis* souche Arkansas (NC_007799) et *Ehrlichia canis* souche Jake (NC_007354), ainsi qu'avec *Anaplasma marginale* souche Ste Maries (NC_004842), une bactérie appartenant à un genre voisin.

Le gène ERGA_CDS_8580 a été utilisé comme contrôle secondaire. Ce gène n'est, en effet, présent que chez *E. ruminantium* et est absent dans les génomes de *E. canis*, *E. chaffeensis* et *A. marginale*. CDS 8580 est présent dans les souches étudiées ici avec un haut degré de conservation ce qui confirme plus encore l'identité de ces souches comme étant bien *E. ruminantium*.

Enfin, un troisième niveau de vérification a été appliqué au niveau du locus *gltA*. En effet, le gène *gltA* présente chez *E. ruminantium* deux petites délétions de trois nucléotides par rapport aux gènes orthologues chez *E. chaffeensis* et *E. canis*. Ces délétions correspondent aux positions 456-459 et 474-477 par rapport au codon d'initiation de *gltA* chez *E. chaffeensis* et *E. canis*. De plus, la séquence nucléotidique 5'-GTGAGTTAGAGTGT-3' située entre les deux délétions est conservée chez toutes les souches d'*E. ruminantium* alors qu'elle ne présente pas d'homologie avec la région correspondante chez *E. chaffeensis* et *E. canis*. Toutes les souches étudiées dans ce travail présentent ces deux délétions, confirmant encore l'identité des souches étudiées comme *E. ruminantium*.

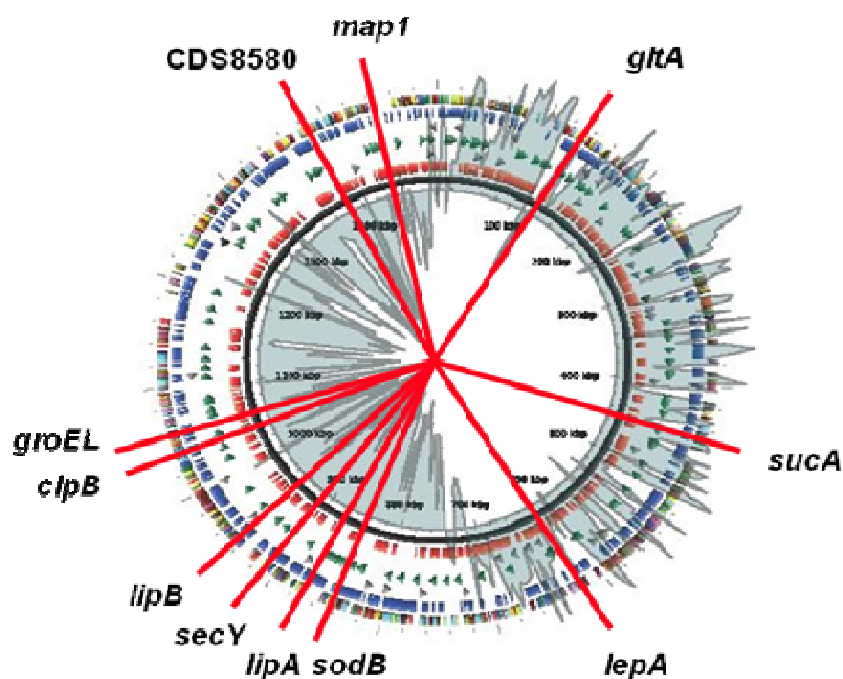


Figure 8 : Répartition des gènes cibles sur le génome d'*E. ruminantium* (souche Gardel)

Cette partie initiale du travail d'analyse de la diversité génétique d'*E. ruminantium* a fait l'objet d'un article intitulé « MLST scheme of *Ehrlichia ruminantium*: Genomic stasis and recombination in strains from Burkina Faso » qui a été publié dans *Infection, Genetics and Evolution*.



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid



MLST scheme of *Ehrlichia ruminantium*: Genomic stasis and recombination in strains from Burkina-Faso

Hassane Adakal^{a,b}, Damien F. Meyer^c, Catherine Carasco-Lacombe^c, Valérie Pinarello^c, Florian Allègre^c, Karine Huber^b, Frederic Stachurski^b, Serge Morand^d, Dominique Martinez^b, Thierry Lefrançois^c, Nathalie Vachieri^{c,1,*}, Roger Frutos^{e,1,**}

^a CIRDES Laboratoire de Biotechnologie (URBIO), 559, 3-51 Avenue du Gouverneur Louveau, B.P.O. 454, Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso

^b Cirad, UMR15, Cirad-Inra, TA-A15/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

^c Cirad, Site de Duclos, 97170 Prise d'eau, Guadeloupe, France

^d CNRS, ISEM, UMR 5554, CNRS-UM2-IRD, Université Montpellier 2 CC065, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

^e Cirad, UMR 17, Cirad-Ird, TA-A17/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 June 2009

Received in revised form 9 August 2009

Accepted 18 August 2009

Available online xxx

Keywords:

Ehrlichia ruminantium

MLST

Phylogeny

Recombination

Genomic stasis

Polymorphism

Genetic diversity

ABSTRACT

Heartwater, caused by the intracellular bacterium *Ehrlichia ruminantium*, is a major tick-borne disease of livestock in Africa also introduced in the Caribbean. The main problem encountered with the control of this disease is the lack of efficient vaccine in the field. This is thought to be related to the high genetic diversity of strains circulating in a same area. A set of eight circulating strains was isolated from a herd of cows in a small locality in Burkina-Faso and analyzed along with two reference strains, i.e. ERGA and ERWO, for which full-length genome was available. A MLST analysis was developed based on the genes *gltA*, *groEL*, *lepA*, *lipA*, *lipB*, *secY*, *sodB* and *sucA*. Phylogeny analysis was conducted both on concatenated MLST loci and on each individual locus. This showed differing phylogenies for each individual target gene. Most of the recorded polymorphism was borne by three strains: 331, 469 and 623. The neutrality hypothesis could not be rejected. Recombination and linkage disequilibrium were shown to have occurred. A core of seven strains displayed little polymorphism and signs of most likely ancient recombination events. The two reference strains, one from the Caribbean separated from west African strains three centuries ago and another one isolated in South Africa, were very closely related to the core strains whereas the three differing strains displayed recombination and most of the parcimony informative sites. These data suggest that some strains are in genomic stasis, as expected for intracellular parasites, while others emerge in the same area with DNA polymorphism. This work also shows that the MLST scheme developed can discriminate between these two kinds of strains.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cowdriosis or heartwater is a tick-borne disease transmitted by *Amblyomma* ticks to domestic and wild ruminants. The bacterial causative agent, *Ehrlichia ruminantium*, is endemic in Sub-Saharan Africa, in Madagascar, and in some Caribbean islands from where it represents a threat to the American mainland (Barré et al., 1987). In endemic areas, heartwater represents a significant obstacle to improvement of livestock production by the introduction of exotic breeds. Several types of vaccines have been developed but they displayed limited efficiency in the field (Collins et al., 2003a,b;

Jongejan, 1991; Mahan et al., 2003; Martinez et al., 1994, 1996; Zweggarth et al., 2005). This is thought to be due to a wide diversity of *E. ruminantium* which was shown to impact cross-protection features (Du Plessis et al., 1989; Adakal et al., 2004) and to their simultaneous circulation in a same region. Several methods and markers were developed to characterize genetic diversity. Out of these, the *map1* gene, encoding the Major surface protein MAP1 used in ELISA tests (Van Vliet et al., 1995), displays a high level of sequence polymorphism between strains (Reddy et al., 1996; Allsopp et al., 2001). However, although *map1* can characterize genetic diversity of strains in field-collected strains (Martinez et al., 2004; Faburay et al., 2007; Raliniaina et al., in press), no correlation could be found with cross-protection between strains. Recombination has been reported in *E. ruminantium* (Hughes and French, 2007; Allsopp and Allsopp, 2007) which could explain at least part of the genetic diversity. *E. ruminantium* is also displaying an active mechanism of genome size plasticity (Frutos et al., 2006,

* Corresponding author.

** Corresponding author. Tel.: +33 4 64 59 39 62; fax: +33 4 67 59 39 60.

E-mail address: roger.frutos@cirad.fr (R. Frutos).

¹ Co-last authors.

2007). On the other hand, *E. ruminantium* is an obligate intracellular parasite which is expected to display genomic stasis after adaptation to intracellular parasitism (Tamas et al., 2002). The *E. ruminantium* genetic diversity is most likely rather complex and there is thus a real need to develop accurate methods for genotyping and characterizing strains as well as for monitoring the structure and dynamics of *E. ruminantium* populations in the field.

We report here the development of a Multilocus Sequence Typing (MLST) scheme for *E. ruminantium* to discriminate even very closely related strains. We also report that strains which are most likely in genomic stasis, but with ancient recombination events, are co-circulating in the same area along with more recently emerged strains bearing most of the nucleotidic polymorphism.

2. Materials and methods

2.1. Field collection of ticks

Amblyomma variegatum ticks were collected in three villages of Bekuy (3.91°W, 11.60°N), Sara (3.83°W, 11.71°N) and Lamba (4.05°W, 11.66°N). Vegetation in the area consists of bushy and woody savannah and in few places, sparse forest. Visible ticks were collected from animals and conserved in 70% ethanol for further species identification. Flat *A. variegatum* ticks were also stored in alcohol while engorged females were allowed to molt, in controlled conditions (27–29 °C temperature and 85–90% relative humidity) to the following stages which were used for DNA extraction.

2.2. *E. ruminantium* detection in ticks

DNA was extracted from individual ticks using the Qiamp DNA extraction kit according to the supplier (Qiagen). Detection of *E. ruminantium* in ticks was conducted by targeting a fragment of *pCS20* gene using a semi-nested PCR as previously described (Waghela et al., 1991; Mahan et al., 1992; Peter et al., 1995; Mahan et al., 1998; Martinez et al., 2004). The semi-nested PCR was slightly modified by the use of primers including universal nucleotides (Molia et al., 2008). Universal primers AB128' (ACTAGTAGAAATTGCACAATCYAT) and AB130' (RCTDGCWGCTT-TYTGTTCAGCTAK) were used as external primers whereas AB128' and AB129' (TGATAACTTGGWGCRRGDARTCCTT) were used as internal primers (Molia et al., 2008). PCR reaction was carried out in a 25 µl volume containing 1 µl of DNA, buffer (Qiagen) (MgCl₂ at 1.5 mM final), 200 mM dATP, 200 mM dGTP 200 mM dCTP and 200 mM dTTP (Eurogentec), 0.4 mM each of the corresponding forward and reverse primers, 1 U/µl Taq polymerase (Qiagen). The first round of semi-nested PCR comprised an initial denaturation step of 3 min at 94 °C followed by 35 amplification cycles of 50 s denaturation at 94 °C, 50 s annealing at 50 °C and 50 s extension at 72 °C with a final extension step of 10 min at 72 °C. The same program was applied to the second round of the semi-nested PCR with an annealing temperature of 55 °C.

2.3. Target loci

Selection of MLST loci was based both on comparative genomic analysis of *E. ruminantium* (Collins et al., 2005; Frutos et al., 2006) and reports of orthologous genes used for MLST analysis on *E. ruminantium* or other pathogens (Allsopp et al., 2003; Allsopp and Allsopp, 2007; Harbottle et al., 2006; Inokuma et al., 2001; McCombie et al., 2006; Ahmed et al., 2006). These genes: *gltA*, *groEL*, *lepA*, *lipA*, *lipB*, *secY*, *sodB* and *sucA* are presented in Supplementary Table 1. Three reference genes were added for polymorphism analysis and evolutionary patterns based on their

previously reported substitution biases as shown by a Fisher exact test (Frutos et al., 2006). *map1* and *clpB* display a statistically significant excess of synonymous substitutions whereas CDS8580 displays a statistically significant excess of nonsynonymous substitutions (Supplementary Table 1). The distribution of the target loci on the genome of *E. ruminantium* strain Gardel is shown in Supplementary Fig. 1. Orthologous genes from the closely related species *Ehrlichia canis* strains Jake (NC_007354), *Ehrlichia chaffeensis* strain Arkansas (NC_007799) and from *Anaplasma marginale* strain Ste Maries (NC_004842) were used for outgroup rooting.

2.4. Primers and PCR reactions

Primers were designed using Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000). To overcome the problem of potential low infection levels of *E. ruminantium* in ticks, each MLST locus was amplified by nested PCR using a double pair of primers (Supplementary Table 1). In most cases, one of the external primers was used for the second PCR in a semi-nested PCR (Supplementary Table 1). PCR amplifications were performed in 50 µl reaction buffer (Qiagen) (MgCl₂ at 1.5 mM final) with 200 mM dATP, 200 mM dGTP 200 mM dCTP and 200 mM dTTP (Eurogentec), 0.4 mM each of the corresponding forward and reverse primers, 1 U/µl Taq polymerase (Qiagen). The first round PCR program consisted of an initial denaturation step of 3 min at 94 °C followed by 15 cycles of 50 s denaturation at 94 °C, 50 s annealing at the relevant temperature according to each gene (Supplementary Table 1) and 50 s elongation at 72 °C followed by a final extension step of 10 min at 72 °C. 40 cycles were performed for the second round under same conditions. The primer pairs of the second round of each nested-PCR were used for sequencing of the corresponding PCR products (sequenced by Cogenics, Meylan, France).

2.5. Sequence alignment, phylogenetic trees and statistics

Consensus sequences were obtained using Nucmer (Kurtz et al., 2004) and Contig Aligner (http://nbc11.biologie.uni-kl.de/framed/left/menu/auto/right/contig_aligner/) and Multiple sequence alignments were conducted with ClustalX2.0.3 (Thompson et al., 1997). Whenever relevant, gap regions were eliminated to perform alignments for phylogenetic purpose. Verification of reading frames was performed with ExPASy Translate tool (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>). Phylogenetic trees were constructed using FigTree 1.2.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>). Similarity and difference matrices were constructed from ClustalX2 alignments using BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999). DNA sequence polymorphism and all subsequent tests were investigated using several functions from the DnaSP5.00.02 package (Librado and Rozas, 2009). Haplotypes (alleles) were calculated according to Nei (1987). Nucleotide diversity, π (π), the average number of nucleotide differences per site between two sequences was calculated according to Nei (1987) and using the Jukes and Cantor (1969) correction. Theta (Watterson's mutation parameter) was calculated from η (η) or from S (Watterson, 1975). η (η) is the total number of mutations, and S is the number of segregating (polymorphic) sites. K_a (the number of nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site), and K_s (the number of synonymous substitutions per synonymous site) for any pair of sequences were calculated according to Nei and Gojobori (1986). Tajima's D test (Tajima, 1989) was used for testing the hypothesis that all mutations are selectively neutral (Kimura, 1983). The D test is based on the differences between the number of segregating sites and the average number of nucleotide differences. The confidence limit of D is assessed according to a two-tailed test (Tajima, 1989). Other tests of neutrality are the

statistical tests D^* and F^* proposed by Fu and Li (1993) for testing the hypothesis that all mutations are selectively neutral. The D^* test statistic is based on the differences between h_s , the number of singletons (mutations appearing only once among the sequences), and η , the total number of mutations (Fu and Li, 1993). The F^* test statistic is based on the differences between h_s , the number of singletons (mutations appearing only once), and k , the average number of nucleotide differences between pairs of sequences (Fu and Li, 1993). The statistical significance of the Fu and Li's F^* and D^* tests was also calculated using a two-tailed test. A last test of neutrality was conducted using Fu's F_s statistic (Fu, 1997). Fu's F_s test (Fu, 1997) is based on the haplotype (gene) frequency distribution to determine the value of θ (Ewens, 1972). Z_nS statistics (Kellly, 1997) is the average of R^2 (Hill and Robertson, 1968) over all pairwise comparisons. It reflects excess of linkage disequilibrium compared with that expected under neutrality. Wall's B statistic (Wall, 1999) is the proportion of congruent pairs of adjacent segregating sites (with common phylogeny), whereas Wall's Q statistics (Wall, 1999) also considers the length of the corresponding region. Significant pairwise associations were assessed by χ^2 , Fisher exact test and Bonferroni procedure.

3. Results

3.1. Identification of isolated strains

The confirmation of the isolated strains as *E. ruminantium* was conducted using a three-way approach. First of all a pCS20 PCR test specific for *E. ruminantium* (Waghela et al., 1991; Mahan et al., 1992, 1998; Peter et al., 1995; Martinez et al., 2004) was conducted and only positive samples were retained for MLST analysis. The CDS 8580, a gene of unknown function which might in fact be a pseudogene (Frutos et al., 2006) was used a secondary control. This CDS is only found in *E. ruminantium* and is absent in the published genomes of *E. canis*, *E. chaffeensis* and *A. marginale*. CDS 8580 was present in all the strains analyzed here with a high degree of conservancy. This confirmed that the strains analyzed here were indeed *E. ruminantium* strains. Finally, the *gltA* gene in *E. ruminantium* displayed two small deletions of three nucleotides each when compared to *gltA* sequences from *E. canis* and *E. chaffeensis*. These deletions were located at position 456–459 and 474–477 with respect to the *gltA* start codon in *E. canis* and *E. chaffeensis*. All the strains analyzed here displayed these deletions. Furthermore, the nucleotide sequence 5'-GTGAGTTAGAGTGT-3' located between these two small deletions was 100% conserved among all the strains studied here whereas it did not match the corresponding region in *E. canis* and *E. chaffeensis*. This further

confirmed that all the strains studied in this work were *E. ruminantium* strains.

3.2. Identification of haplotypes (alleles) and sequence types (ST)

E. ruminantium strain 2 was selected as the reference strain for ST determination. As a consequence strain 2 carried the haplotype (allele) 1 for all the loci considered. STs and loci polymorphism are presented in Table 1. Haplotypes sequences are shown in supplementary material (Supplementary Table 2). Sequences were deposited in GenBank and accession numbers are displayed in Supplementary Table 2. The overall number of haplotypes identified among the 10 strains analyzed were 3, 5, 4, 3, 8, 6, 3 and 7 for *gltA*, *groEL*, *lepA*, *lipA*, *lipB*, *secY*, *sodB* and *sucA*, respectively (Table 1). This variation in the number of alleles from one locus to another did not, however, reflect the polymorphism in the target gene segment amplified. Polymorphic sites or S (i.e. number of mutated sites per locus) varied from 4 to 45 (Table 1). When weighting these data by considering the size of the amplified fragment, the resulting percentage of site polymorphism varied from 0.96% to 9.84% (Table 1). However, 6 out of 8 loci displayed percentage of polymorphism below 4% with only *groEL* displaying 9.84% variability. There was no linear correlation between the number of haplotypes and the number of polymorphic sites, or the percentage of polymorphisms, indicating thus that a very few number of strains carry most of the observed polymorphism on a limited number of haplotypes. When considering both the sequence identity matrix and the sequence difference matrix (Supplementary Table 3), three strains appeared clearly more divergent: strains 331 and 469 on one hand and strain 623 on the other hand.

3.3. Phylogenetic analysis from concatenated sequences

When using midpoint rooting (Fig. 1a), the group comprising strains 331 and 469 was separated from 1062 with a node bootstrap value of 1000. Strain 1062 branches separately and associates to a bootstrap value of 873. When considering the closely related species *E. chaffeensis* (Fig. 1b), *E. canis* (Fig. 1c) and the Rickettsial *A. marginale* (Fig. 1d) as an outgroup, the topology was slightly different with no first order significant bootstrap values excepted for the strains 331 and 469 which consistently branch separately with a bootstrap of 1000.

3.4. Phylogeny of individual MLST loci

To further clarify the role of the various haplotypes and loci in the overall diversity displayed by the concatenated sequences, a

Table 1
Summary of STs for the *E. ruminantium* strains considered.

Strains	MLST loci							
	<i>gltA</i>	<i>groEL</i>	<i>lepA</i>	<i>lipA</i>	<i>lipB</i>	<i>secY</i>	<i>sodB</i>	<i>sucA</i>
Strain 2	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 331	3	4	4	3	6	6	3	5
Strain 469	3	5	4	3	6	6	3	5
Strain 623	1	2	2	2	2	2	2	2
Strain 629	1	3	1	1	7	5	1	1
Strain 630	1	3	1	1	7	1	1	6
Strain 668	1	3	3	1	3	3	1	3
Strain 1062	1	3	1	1	8	5	2	7
ERGA	1	1	3	1	4	1	1	2
ERWO	2	4	2	1	5	4	1	4
N Haplotypes	3	5	4	3	8	6	3	7
S	10	44	7	6	13	25	4	16
Polymorphism (%)	2.53	9.84	1.47	1.76	3.63	4.26	0.96	3.99
Size (bp)	395	447	475	341	358	587	415	401

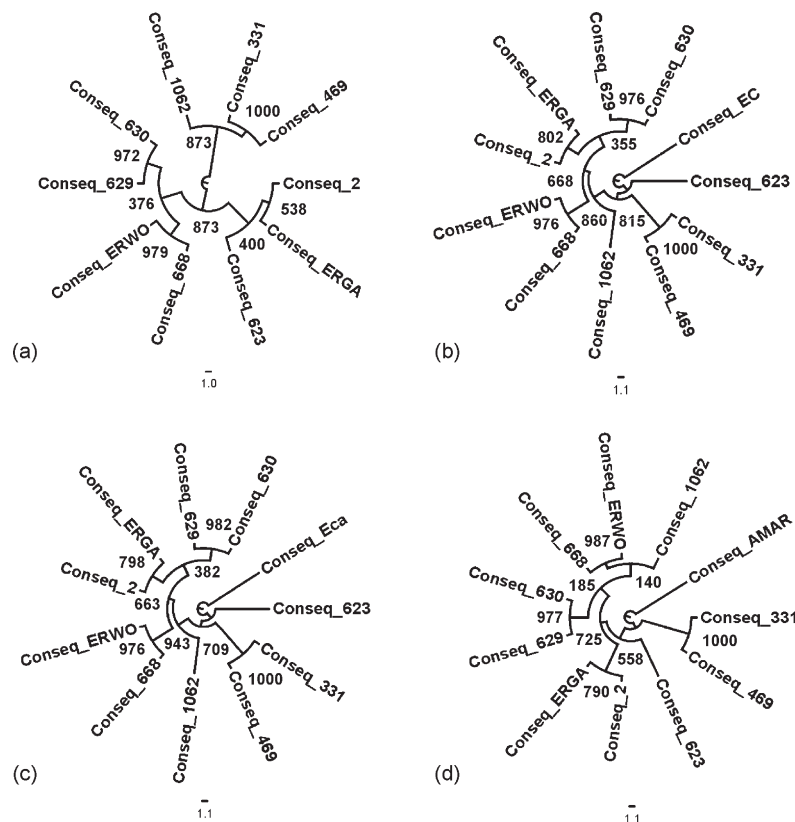


Fig. 1. Neighbor-joining trees of the concatenated MLST loci sequences. (a) NJ tree drawn using a midpoint rooting; (b) NJ tree drawn using *E. chaffeensis* str. Arkansas concatenated orthologous sequences as an outgroup; (c) NJ tree drawn using *E. canis* str. Jake concatenated orthologous sequences as an outgroup; (d) NJ tree drawn using *A. marginale* str. St. Maries concatenated orthologous sequences as an outgroup. Bootstrap values were calculated for nodes. *E. chaffeensis* strain Arkansas-genome accession number: NC_007799; *E. canis* strain Jake-genome accession number: NC_007354; *A. marginale* strain Ste Maries-genome accession number: NC_004842.

similar phylogenetic analysis was conducted on each locus considered separately. For each locus, trees were constructed with both midpoint rooting and outgroup rooting using the relevant orthologous genes from *E. chaffeensis*, *E. canis* or *A. marginale* as an outgroup. In contrast to distributions obtained with concatenated sequences, identical results were obtained for each locus with both midpoint and outgroup rooting. Therefore, only midpoint rooting distribution was shown in Fig. 2. Tree topologies were different to those observed for the concatenated sequences. Furthermore, different topologies were observed for each locus (Fig. 2) with the exception of *gltA*, *lipA* and *sodB*. Although no common phylogenetic pathway could be inferred from these individual locus alignments, some conserved features were still present, the main one being the recurrent clustering of strains 331 and 469 apart from all the other strains. The only exception to this trend was the *groEL* locus for which strains 331 and 469 were separated within different clusters. Interestingly, *groEL* displayed a trichotomy in which strains 331 and 469 occupied a different branch whereas the third corresponded to strain 623, the third most diverging strain (Fig. 2). The latter also branched separately in most of the single-locus trees, although to a lower extent when compared to strains 331 and 469. To further investigate this aspect, MLST loci were compared to three other loci which have been previously shown through whole-genome comparative genomic analysis to display a statistically significant bias of synonymous/nonsynonymous substitutions (Frutos et al., 2006). Two loci, the major antigenic protein gene *map1* and the chaperone gene *clpB* were characterized by a distorted excess of synonymous substitutions (purifying selection) whereas a third one, CDS8580, was characterized by a significant bias towards nonsynonymous substitutions (positive selection). *map1* and

CDS8580, displayed a highly structured clustering characterized by high bootstrap values (Fig. 3). Interestingly, these two loci also discriminated the 331/469 strains as a separate clade. *clpB*, behaved in a similar way as the MLST loci although yielding a different topology (Fig. 3).

3.5. DNA sequence polymorphism and selective pressure

To investigate this diversity in the topology of phylogenetic trees, the different sequences were tested for polymorphism and selective pressure. Comparative analysis of the DNA sequence polymorphism parameters is presented in Supplementary Table 4. *Ka/Ks* (dn/ds) ratio for the MLST loci was rather low with values ranging from 0.034 to 0.139. The reference loci *map1* and *clpB* display *Ka/Ks* ratio of 0.146 and 0.048, respectively. CDS8580 displayed a very high *Ka/Ks* value of 1.491. Several neutrality tests, i.e. Tajima's D, Fu and Li's F^* and D^* and Fu's F_s , were also conducted on the loci sequences (Table 2). The most important feature with the Tajima's D figures was that all tests, for all the loci considered, had no statistical significance indicating thus that the hypothesis of neutral evolution could not be rejected in any of the cases. Fu and Li's D^* and F^* neutrality tests were also applied. Interestingly, the only two loci displaying negative F^* and D^* data were again the chaperone *groEL* and *clpB*, but even more interestingly, none of these tests was statistically significant, indicating again, that the hypothesis of neutral evolution could not be rejected. A third kind of neutrality test, was therefore applied, Fu's F_s which is based on haplotype frequency distribution for a given value of θ derived from the average number of pairwise nucleotide differences. Fu's F_s was negative in the presence of an excess of rare alleles (excess of recent mutations – genetic

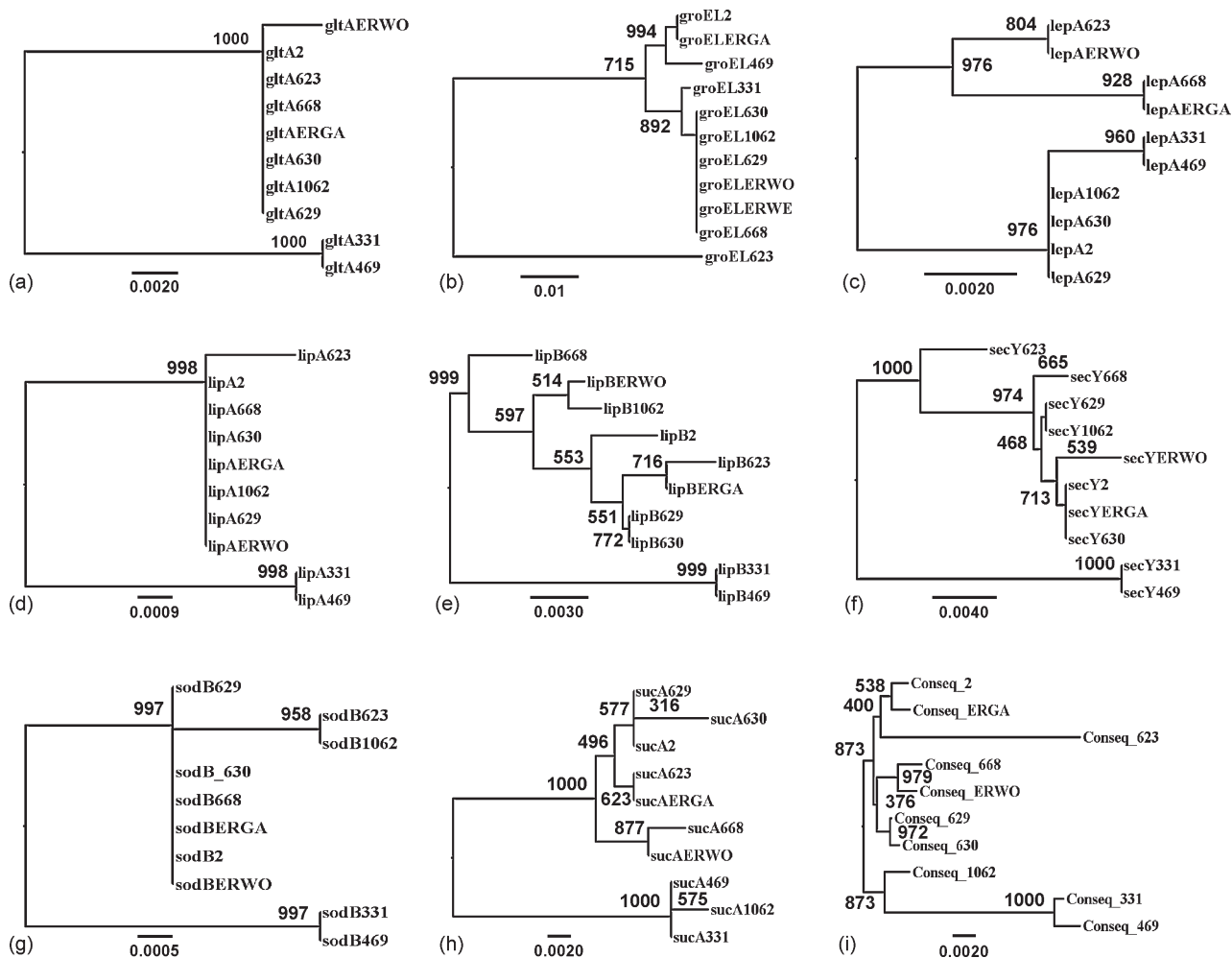


Fig. 2. Neighbor-joining trees of the individual MLST loci sequences: (a) *gltA*; (b) *groEL*; (c) *lepA*; (d) *lipA*; (e) *lipB*; (f) *secY*; (g) *sodB*; (h) *sucA*; (i) concatenated sequences (identical to Fig. 1a). All trees are midpoint rooted. Midpoint and outgroup rooting using *E. canis* str. Jake, *E. chaffeensis* str. Arkansas or *A. marginale* str. St. Maries orthologous sequences yielded the exact same trees. Bootstrap values were calculated for nodes.

hitchhiking – population expansion). Data obtained from Fu's F_s test did not correlate with those from other tests (Table 2). These discrepancies and lack of significance with all the neutrality tests applied, added to the previous observation that the variability was borne by few strains on few loci, led to the implementation of the same neutrality tests while excluding in turn two sets of strains (Table 2). The first set to be excluded was the reference strains ERGA and ERWO. The second set of strains to be excluded was

strains 331, 469 and 623 which carried most of the genetic variability (Supplemental Table 3, Fig. 2).

3.6. Assessment of the presence of recombination events

The various tests mentioned above are specifically susceptible to recombination which could easily blur the whole figure. Furthermore, this could also explain the contradictory tree

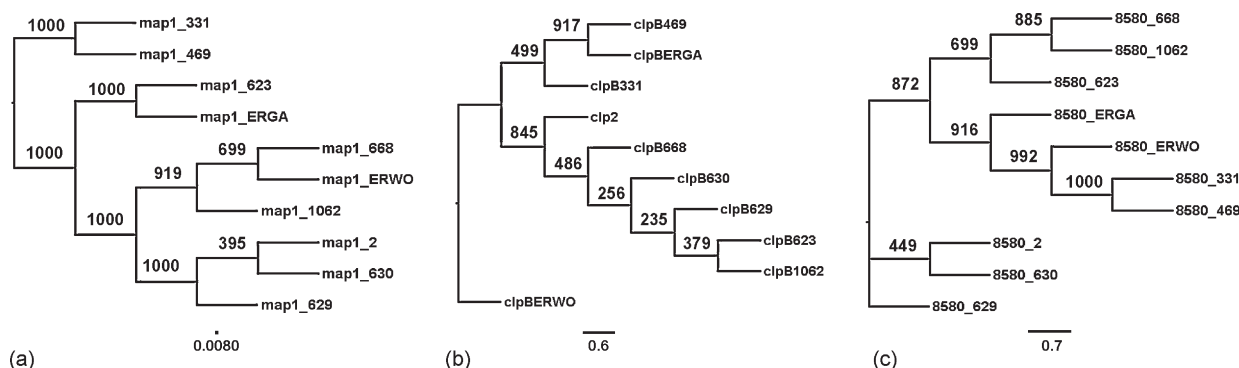


Fig. 3. Neighbor-joining trees of the individual reference genes: (a) *map1*; (b) *clpB*; (c) CDS8580. All trees are midpoint rooted. Midpoint and outgroup rooting using *E. canis* str. Jake, *E. chaffeensis* str. Arkansas or *A. marginale* str. St. Maries orthologous sequences yielded the exact same trees. Bootstrap values were calculated for nodes.

Table 2
Assessment of selective pressure on three subsets of *E. ruminantium* strains.

	Full set (10 strains)				Δ ERGA–ERWO (8 strains)				Δ 331/469/623 (7 strains)			
	Tajima's D	F*	D*	Fu's Fs	Tajima's D	F*	D*	Fu's Fs	Tajima's D	F*	D*	Fu's Fs
gltA	−0.1691 ^{NS}	0.8713 ^{NS}	1.0846 ^{NS}	3.493	0.5448 ^{NS}	1.4025 ^{NS}	1.48571 ⁺	5.660	−1.00623 ^{NS}	−1.10146 ^{NS}	−1.04881 ^{NS}	−0.095
groEL	−1.4919 ^{NS}	−1.8088 ^{NS}	−1.9533 ^{NS}	4.152	−1.39245 ^{NS}	−1.44979 ^{NS}	−1.60206 ^{NS}	3.162	0.86284 ^{NS}	1.47500 ^{NS}	1.49166 ⁺	4.745
lepA	0.9377 ^{NS}	1.4291 ^{NS}	1.3821 ^{NS}	1.567	−0.41500 ^{NS}	−0.07272 ^{NS}	0.03986 ^{NS}	0.583	1.04431 ^{NS}	1.05865 ^{NS}	0.95066 ^{NS}	2.167
lipA	−0.2792 ^{NS}	0.5790 ^{NS}	0.7749 ^{NS}	1.955	0.15875 ^{NS}	0.78299 ^{NS}	0.87595 ^{NS}	1.981	−0.38255 ^{NS}	−0.41257 ^{NS}	−0.36923 ^{NS}	4.780
lipB	0.5327 ^{NS}	0.9210 ^{NS}	0.9121 ^{NS}	−1.917	0.67142 ^{NS}	1.02698 ^{NS}	1.00248 ^{NS}	−0.221	0.34514 ^{NS}	0.21071 ^{NS}	0.14917 ^{NS}	−2.200
secY	0.0637 ^{NS}	0.6745 ^{NS}	0.7753 ^{NS}	1.836	0.58311 ^{NS}	1.11204 ^{NS}	1.12603 ^{NS}	2.355	−0.33025 ^{NS}	−0.39280 ^{NS}	−0.37037 ^{NS}	−0.226
sodB	0.0224 ^{NS}	1.0547 ^{NS}	1.2391 ^{NS}	1.194	0.48523 ^{NS}	1.23248 ^{NS}	1.31251 ^{NS}	1.243	−1.00623 ^{NS}	−1.10146 ^{NS}	−1.04881 ^{NS}	−0.095
sucA	0.6637 ^{NS}	0.6564 ^{NS}	0.5558 ^{NS}	−0.132	0.86894 ^{NS}	0.61328 ^{NS}	0.45537 ^{NS}	0.265	−1.09826 ^{NS}	−1.23869 ^{NS}	−1.13318 ^{NS}	−1.037
clpB	−0.9635 ^{NS}	−1.1435 ^{NS}	−1.2372 ^{NS}	0.765	−1.21921 ^{NS}	−1.27919 ^{NS}	−1.13595 ^{NS}	0.702	−1.10893 ^{NS}	−1.16817 ^{NS}	−1.05316 ^{NS}	0.812
map1	0.4800 ^{NS}	1.3210 ^{NS}	1.3988 ^{NS}	6.052	0.18612 ^{NS}	0.50172 ^{NS}	0.52969 ^{NS}	8.104	0.48009 ^{NS}	1.32105 ^{NS}	1.39881 ⁺	6.052
CDS8580	−0.0967 ^{NS}	0.3926 ^{NS}	0.4957 ^{NS}	1.892	0.66954 ^{NS}	1.45663 ^{NS}	1.50216 ⁺	3.169	−1.01530 ^{NS}	−1.11759 ^{NS}	−1.01143 ^{NS}	3.065

NS: statistically not significant.
+ Statistically significant at $P < 0.05$.

topologies observed in Figs. 2 and 3. The putative presence of recombination events was therefore analyzed on the same three sets of strains: the full set (all 10 strains), after exclusion of ERGA and ERWO (Δ ERGA–ERWO) and after exclusion of strains 331, 469 and 623 (Δ 331–469–623). These data are summarized in Table 3. Putative recombination was assessed both by estimating the minimum number of recombination, Rm, for each locus according to the four gametes model (Hudson and Kaplan, 1985). The presence of codons with multiple evolutionary pathways was also detected. When analyzing the full set of sequences, which includes the reference strains ERGA and ERWO as well as the strains 331, 469 and 623, some elements immediately appeared. At first, several recombination events were detected among the MLST loci as well as among the reference loci. The loci bearing the highest number of recombination events were *map1* and CDS8580 (Table 3). Considering the second set of strains, excluding ERGA and ERWO, data were almost the same as with the whole set of loci for the MLST targets, the only difference being a slight increase of θ (theta). A difference however appeared in the case of *map1* and CDS8580 with a decrease of Rm. As expected, the removal of strains 331/469/623 eliminated almost all polymorphism. Rm and MEP were also affected but differently depending on the locus (Table 3). In the case of *groEL*, Rm became null indicating that these strains bore the detected recombination events. The maximum effect was observed with *lipA* for which all polymorphism was eliminated. *sucA* also displayed a decrease of Pa whereas S and η remained the same, which was indicative of an excess of singletons and an expansion of population. Some recombination events were detected in this set indicating that if most of the detected recombination events were associated with the three strains removed, i.e. 331, 469 and 623, other events were associated with the remaining strains. *map1* was highly affected by recombination and half of these detected events were present in the subset comprising strains 331, 469 and 623.

3.7. Assessment of linkage disequilibrium

Linkage disequilibrium is the non-random association of two sites and is therefore expected to be affected by recombination. Table 4 presents the same subsets of strains as in Tables 2 and 3, but with an assessment of linkage disequilibrium. Significant associations are found but following a differing pattern depending upon strains and loci (Table 4). When the whole set of strains is considered, variation in congruence between loci seems to follow the distribution of putative recombination (Table 3) the lowest level of congruence being associated to the loci for which recombination was detected. Congruence seems to increase for *groEL* and *lipA* when strains 331, 469 and 623 are removed. Congruence decreases for *secY* and *lipB* when these same three

strains are removed confirming that for these loci polymorphism is on the remaining strain. Linkage disequilibrium seems to be more evenly distributed for *sucA* and the three reference loci, i.e. *clpB*, *map1* and CDS8580 (Table 4).

4. Discussion

The data reported here on the development of a MLST scheme for *E. ruminantium* is a step forward to precise genotyping of this bacterium. This MLST scheme is capable of clearly discriminating between even closely related strains, such as for instance strains 331 and 469. The use of MLST coupled with the results of cross-protection assays will allow to define protective groups of strains and to identify putative vaccinal strain. PCR-based method are efficient for detecting *E. ruminantium* in hosts and ticks (Peter et al., 1995) and to characterize isolates of *E. ruminantium* from related species (Allsopp et al., 1997; Bekker et al., 2002; Vachier et al., 2008; Raliniaina et al., in press) but routine strain-specific diagnosis is not yet achieved. This work is the first MLST scheme developed on *E. ruminantium* although preliminary investigations have been previously reported (Allsopp and Allsopp, 2007).

A critical point in developing this MLST approach was not only to obtain accurate genotyping markers but also to address issues such as genome plasticity, recombination and genetic background of the circulating strains. These phenomena are clearly affecting strains evolution and pathogenicity and must be addressed more in depth. *E. ruminantium* has been reported to display a dynamic mechanism of genome size plasticity (Frutos et al., 2006, 2007). Similarly, recombination has been reported and is suspected to be involved in genetic diversity (Hughes and French, 2007; Allsopp and Allsopp, 2007; Bekker et al., 2005). However, recombination in *E. ruminantium* has never been studied on a relevant set of strains. Hughes and French (2007) have addressed it from a statistical and evolutionary standpoint but only on the three published genomes (Collins et al., 2005; Frutos et al., 2006). Allsopp and Allsopp (2007) have reported massive intergenome recombination events in *E. ruminantium* strains in the field, but solely based upon DNA alignments and without statistics on DNA polymorphism and evolutionary trends. This work was therefore designed to specifically address both fine genotyping and DNA polymorphism statistical analysis on a well defined sampling allowing for identification of evolutionary trends.

The strain ERWO isolated from South Africa was reported to be highly divergent from strain ERGA and from strains from Western Africa (Allsopp and Allsopp, 2007). A lack of recombination between Western and South-Eastern African strains was also reported (Allsopp and Allsopp, 2007) and that ERGA was clearly different and representative of ancestral line. The data reported here are in contradiction with this conclusion. Strains closely

Table 3
Assessment of recombination events in three subsets of *E. ruminantium* strains.

Hp	Full set (10 strains)							Δ ERGA-ERWO (8 strains)							Δ 331/469/623 (7 strains)									
	Pa	S	η	θ	π	Rm	MEP	Hp	Pa	S	η	θ	π	Rm	MEP	Hp	Pa	S	η	θ	π	Rm	MEP	
<i>gltA</i>	3	10	10	10	3.400	0.00861	0	0	2	9	9	9	3.857	0.00976	0	0	2	0	1	1	0.286	0.00072	0	0
<i>groEL</i>	5	8	44	47	11.533	0.02580	3	3	5	8	44	47	13.429	0.03004	3	3	2	7	7	7	11.533	0.00746	0	0
<i>lepA</i>	4	7	7	7	3.022	0.00636	0	0	4	4	7	7	2.464	0.00519	0	0	3	5	6	6	2.952	0.00622	0	0
<i>lipA</i>	3	5	6	6	1.978	0.00580	0	0	3	5	6	6	2.393	0.00702	0	0	1	0	0	0	0.00000	0.00000	0	0
<i>lipB</i>	8	11	13	13	5.133	0.01434	3	1	6	11	13	13	5.679	0.01586	3	1	6	4	7	7	3.048	0.00851	1	0
<i>secY</i>	6	20	25	25	8.956	0.01526	2	0	5	20	23	23	9.857	0.01679	2	0	4	2	5	5	1.905	0.00324	1	0
<i>sodB</i>	3	4	4	4	1.422	0.00343	0	0	3	4	4	4	1.714	0.00413	0	0	2	0	1	1	0.286	0.00069	0	0
<i>sucA</i>	7	12	16	16	6.467	0.01613	1	0	6	11	16	16	7.214	0.01799	1	0	6	3	16	16	5.238	0.01306	1	0
<i>clpB</i>	5	4	13	13	3.622	0.00583	1	0	4	2	9	9	2.607	0.00420	0	0	4	2	10	10	3.238	0.00521	0	0
<i>map1</i>	7	141	149	159	61.622	0.09524	21	3	5	109	147	156	62.214	0.09616	18	3	5	42	97	100	38.143	0.05895	10	5
<i>CDS 8580</i>	7	32	40	44	15.244	0.05863	7	1	5	30	31	31	13.464	0.05179	1	0	4	6	25	26	8.714	0.05863	3	0

HP: haplotypes; PA: parcimony informative sites; S: polymorphic sites; η : total number of mutations; θ : Watterson's mutation parameter; π : nucleotide diversity; Rm: minimal recombination events; MEP: codon with multiple evolutionary pathway.

Table 4
Assessment of linkage disequilibrium in three subsets of *E. ruminantium* strains.

	Full set (10 strains)							Δ ERGA-ERWO (8 strains)							Δ 331/469/623 (7 strains)						
	ZnS	B	Q	PW	χ^2	F		ZnS	B	Q	PW	χ^2	F		ZnS	B	Q	PW	χ^2	F	
<i>gltA</i>	0.8056	0.7778	0.8000	45	36	36		1.0000	1.0000	1.0000	36	36	36		NA	NA	NA	0	0	0	
<i>groEL</i>	0.7372	0.6750	0.6829	820	600	4		0.7461	0.6750	0.6829	820	567	1		1.0000	1.0000	1.0000	21	21	21	
<i>lepA</i>	0.3899	0.1667	0.2857	21	4*	4		0.3988	0.1667	0.2857	21	4	3		0.5333	0.4000	0.5000	1	4	4	
<i>lipA</i>	0.6759	0.6000	0.6667	15	10*	10		0.6825	0.6000	0.6667	15	10	10		NA	NA	NA	0	0	0	
<i>lipB</i>	0.3061	0.0833	0.1538	78	25	12		0.3217	0.0833	0.1538	78	24	11		0.2343	0.3333	0.5714	21	4	1	
<i>secY</i>	0.4666	0.3750	0.4400	300	155	88		0.5350	0.4091	0.4783	253	154	88		0.2786	0.2500	0.4000	10	1	0	
<i>sodB</i>	0.5313	0.3333	0.5000	6	3*	3		0.5556	0.3333	0.5000	6	3*	3		NA	NA	NA	0	0	0	
<i>sucA</i>	0.4276	0.2000	0.2500	120	56	36		0.4656	0.2000	0.2500	120	56	36		0.4656	0.2000	0.2500	120	46	0	
<i>clpB</i>	0.2221	0.0833	0.1538	78	14	2		0.3001	0.1250	0.2222	36	6	1		0.3294	0.0000	0.0000	45	9	1	
<i>map1</i>	0.3327	0.2391	0.2734	9591	2248	1862		0.3659	0.2628	0.2971	9453	3145	1576		0.3885	0.3763	0.4468	4371	1206	111	
<i>CDS 8580</i>	0.3894	0.1429	0.1667	630	277	121		0.8252	0.7667	0.7742	465	352	351		0.4512	0.3478	0.4167	276	91	3	

ZnS: ZnS statistic (Kelly, 1997). ZnS is the average of R^2 (Hill and Robertson, 1968) over all pairwise comparisons. B: Wall's B statistics (Wall, 1999); Q: Wall's Q statistics (Wall, 1999); PW: number of pairwise comparisons; χ^2 : number of significant associations tested by chi-square test; F: number of significant associations tested by a fisher exact test.

* Significant associations confirmed by the Bonferroni procedure.

related to both ERGA and ERWO are currently circulating in Burkina-Faso which contradicts the previous statement that ERGA is a unique genotype accidentally brought to the Caribbean (Allsopp and Allsopp, 2007). It is also not possible to confirm that the South-Eastern African continent is the centre of diversity of *E. ruminantium* (Allsopp and Allsopp, 2007). The higher diversity observed in this region when compared to Western Africa might simply be due to a biased sampling.

Based on nucleotide substitution rates, ERGA and ERWO were reported to have diverged from a common ancestor between 2 and 4 million years ago (Hughes and French, 2007). The rationale behind this was a molecular clock associated to the *Ka/Ks* ratio and the assumption that accumulation and fixation of mutations through time is representative of the segregating polymorphisms and genetic distances. However, the work described here brings elements to modulate this conclusion.

Both ERGA and ERWO are not only closely related to strains currently circulating in Burkina-Faso but remained unchanged, especially in the case of ERGA, even through spatial and temporal isolation. This is in accordance with the paradigm of genomic stasis which characterizes obligate intracellular bacteria. Indeed, following initial genome size reduction and massive loss of genes as part of the adaptation to the intracellular lifestyle (Moran and Mira, 2001; Moran and Plague, 2004; Sallstrom and Andersson, 2005), the genome of cell parasites remain highly stable over long periods of time (Tamas et al., 2002; Klasson and Andersson, 2004). This seems to be the case also with *E. ruminantium*. The differences observed between ERGA and ERWO might not thus be due to regular accumulation over time but rather a consequence of the divergence process. Recombinations are most likely to have occurred at that time and to have blurred the phylogeny as observed in this work. Accumulation of mutations may also occur through pseudogenes decay. Pseudogenes content is very high in *E. ruminantium* (Collins et al., 2005; Frutos et al., 2006, 2007) and active creation (Collins et al., 2005) as well as decay (Frutos et al., 2007) have been demonstrated. Straight molecular clock cannot be used in the case of *E. ruminantium* and the reported dates of separation should be reconsidered. Furthermore, the *Ka/Ks* ratio used for establishing molecular clock and evolutionary trends is not a reliable marker of evolution at the infraspecific level. Indeed, the relationship between selection and *Ka/Ks* does not follow a monotonic function and it is therefore impossible to infer selection pressures, positive or negative, from *Ka/Ks* (Kryazhimskiy and Plotkin, 2008).

What is however clear from this work is that there is currently, at least in the sampled part of Burkina-Faso, simultaneous circulation of strains apparently in genomic stasis and others in a diverging state which bears most the observed diversity. Recombination is recorded in all groups and is a still active mechanism and most likely an important factor in *E. ruminantium* evolution. They have obviously accumulated mutations and undergone recombination, but it is not possible to say what triggered this active evolutionary state when compared to the other strains in genomic stasis. This might be also considered along with the previously reported active mechanism of genome size plasticity, although nothing is known either about it (Frutos et al., 2006, 2007). This work nevertheless suggests that the evolution of *E. ruminantium* is complex with apparently contradictory phenomena involved, i.e. genomic stasis and recombination, being present in co-circulating strains. However, this work is based on a limited number of strains and must be confirmed on a larger set of strains in the same sampling area to draw more definitive conclusions. Two further steps to consider will be to sample in the same region over several years and to extend it to other geographic regions.

Acknowledgements

This work was supported by EC FP6 INCO-DEV grant “Epigenevac” FP6-003713. H. Adakal was supported by Agence Universitaire pour la Francophonie (AUF) mobility grant program and by mobility grants from CIRAD. The authors are grateful to B. Godelle (ISEM-UM2) for fruitful discussion and comments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.meegid.2009.08.003.

References

- Adakal, H., Bada-Alamedji, R., Stachurski, F., 2004. Etude de la variabilité antigénique d'*Ehrlichia ruminantium* dans la région sud-ouest du Burkina Faso en vue de l'application d'une vaccination. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales* 2, 132–137.
- Ahmed, N., Devi, S.M., Valverde, M. de L., Vijayachar, P., Machang'u, R.S., Ellis, W.A., Hartskeerl, R.A., 2006. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5, 28 doi:10.1186/1476-0711-5.
- Allsopp, M.T.E.P., Allsopp, B.A., 2007. Extensive genetic recombination occurs in the field between different genotypes of *Ehrlichia ruminantium*. *Vet. Microbiol.* 124, 58–65.
- Allsopp, M., Visser, E.S., du Plessis, J.L., Vogel, S.W., Allsopp, B.A., 1997. Different organisms associated with heartwater as shown by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Vet. Parasitol.* 71, 283–300.
- Allsopp, M.T.E.P., Dorfling, C.M., Maillard, J.C., Bensaid, A., Haydon, D.T., van Heerden, H., Allsopp, B.A., 2001. *Ehrlichia ruminantium* major antigenic protein gene (map1) variants are not geographically constrained and show no evidence of having evolved under positive selection pressure. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4200–4203.
- Allsopp, M.T., Van Heerden, H., Steyn, H.C., Allsopp, B.A., 2003. Phylogenetic relationships among *Ehrlichia ruminantium* isolates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 990, 685–691.
- Barré, N., Uilenberg, G., Morel, P.C., Camus, E., 1987. Danger of introducing heartwater onto the American mainland: potential role of indigenous and exotic *Amblyomma* ticks. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 54, 406–416.
- Bekker, C.P.J., De Vos, S., Taoufik, A., Sparagano, O.A.E., Jongejan, F., 2002. Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. *Vet. Microbiol.* 89, 223–238.
- Bekker, C.P.J., Postigo, M., Taoufik, A., Bell-Sakyl, L., Ferraz, C., Martinez, D., Jongejan, F., 2005. Transcription analysis of the major antigenic protein 1 multigene family of three in vitro cultured *Ehrlichia ruminantium* isolates. *J. Bacteriol.* 187, 4782–4791.
- Collins, N.E., Liebenberg, J., De Villiers, E.P., Brayton, K.A., Louw, E., Pretorius, A., Faber, F.E., Van Heerden, H., Josemans, A., Van Kleef, M., Steyn, H.C., van Striip, M.F., Zweggarth, E., Jongejan, F., Maillard, J.C., Berthier, D., Botha, M., Joubert, F., Corton, C.H., Thomson, N.R., Allsopp, T.M., Allsopp, B.A., 2005. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable number. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 838–843.
- Collins, N.E., Pretorius, A., van Kleef, M., Brayton, K.A., Allsopp, T.M., Zweggarth, E., Allsopp, B.A., 2003b. Development of improved attenuated and nucleic acid vaccines for heartwater. *Dev. Biol.* 114, 121–136.
- Collins, N.E., Pretorius, A., Van Kleef, M., Brayton, K.A., Zweggarth, E., Allsopp, B.A., 2003a. Development of improved vaccines for heartwater. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 990, 474–484.
- Du Plessis, J.L., Van Gas, L., Olivier, J.A., Bezuidenhout, J.D., 1989. The heterogeneity of *Cowdria ruminantium* stocks: cross-immunity and serology in sheep and pathogenicity to mice. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 56, 195–201.
- Ewens, W.J., 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theor. Pop. Biol.* 3, 87–112.
- Faburay, B., Jongejan, F., Taoufik, A., Ceesay, A., Geysen, D., 2007. Genetic diversity of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks and small ruminants in The Gambia determined by restriction fragment profile analysis. *Vet. Microbiol.* 126, 189–199.
- Frutos, R., Viari, A., Ferraz, C., Morgat, A., Eychenié, S., Kandassamy, Y., Chantal, I., Bensaid, A., Coissac, E., Vachieri, N., Demaille, J., Martinez, D., 2006. Comparative genomic analysis of three strains of *Ehrlichia ruminantium* reveals an active process of genome size plasticity. *J. Bacteriol.* 188, 2533–2542.
- Frutos, R., Viari, A., Vachieri, N., Boyer, F., Martinez, D., 2007. *Ehrlichia ruminantium*: genomic and evolutionary features. *Trends Parasitol.* 23, 414–419.
- Fu, Y.X., Li, W.H., 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133, 693–709.
- Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915–925.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids. Symp. Ser.* 41, 95–98.

- Harbottle, H., White, D.G., McDermott, P.F., Walker, R.D., Zhao, S., 2006. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. J. Clin. Microbiol. 44, 2449–2457.
- Hill, W.G., Robertson, A., 1968. Linkage disequilibrium in finite populations. Theor. Appl. Genet. 38, 226–231.
- Hudson, R.R., Kaplan, N.L., 1985. Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. Genetics. 111, 147–164.
- Hughes, A.L., French, J.O., 2007. Homologous recombination and the pattern of nucleotide substitution in *Ehrlichia ruminantium*. Gene 387, 31–37.
- Inokuma, H., Brouqui, P., Drancourt, M., Raoult, D., 2001. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. J. Clin. Microbiol. 39, 3031–3039.
- Jongejan, F., 1991. Protective immunity to heartwater (*Cowdria ruminantium* infection) is acquired after vaccination with in vitro-attenuated *Rickettsiae*. Infect. Immun. 59, 729–731.
- Jukes, T.H., Cantor, C.R., 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro, H.N. (Ed.), Mammalian Protein Metabolism. Academic Press, New York, pp. 21–132.
- Kelly, J.K., 1997. A test of neutrality based on interlocus associations. Genetics 146, 1197–1206.
- Kimura, M., 1983. The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge University Press, Cambridge, MA, USA.
- Klasson, L., Andersson, S.G.E., 2004. Evolution of minimal-gene-sets in host-dependent bacteria. Trends Microbiol. 12, 37–43.
- Kryazhimskiy, S., Plotkin, J.B., 2008. The population genetics of dN/dS. PLoS Genet. 4, e1000304.
- Kurtz, A., Phillippy, A.L., Delcher, M., Smoot, M., Shumway, C., Antonescu, S.L., Salzberg, 2004. Fast algorithms for large-scale genome alignment and comparison. Genome Biol. 5, R12.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25, 1451–1452.
- Mahan, S.M., Peter, T.F., Simbi, B.H., Burrridge, M.J., 1998. PCR detection of *Cowdria ruminantium* infection in ticks and animals from heartwater-endemic regions of Zimbabwe. Trop. Vet. Med. 849, 85–87.
- Mahan, S.M., Barbet, A.F., Burrridge, M.J., 2003. Development of improved vaccines for heartwater. Dev. Biol. 114, 137–145.
- Mahan, S.M., Waghela, S.D., McGuire, T.C., Rurangirwa, F.R., Wassink, L.A., Barbet, A.F., 1992. A cloned DNA probe for *Cowdria ruminantium* hybridizes with eight heartwater strains and detects infected sheep. J. Clin. Microbiol. 30, 981–986.
- Martinez, D., Vachieri, N., Stachurski, F., Kandassamy, Y., Raliniaina, M., Aprelon, R., Gueyve, A., 2004. Nested PCR for the detection and genotyping of *Ehrlichia ruminantium*, Use in genetic diversity analysis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1026, 106–113.
- Martinez, D., Maillard, J.C., Coisne, S., Sheikboudou, C., Bensaid, A., 1994. Protection of goats against heartwater acquired by immunisation with inactivated elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. Vet. Immunol. Immunopathol. 41, 153–163.
- Martinez, D., Perez, J.M., Sheikboudou, C., Debus, A., Bensaid, A., 1996. Comparative efficacy of Freund's and Montanide ISA50 adjuvants for the immunisation of goats against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. Vet. Parasitol. 67, 175–184.
- McCombie, R.L., Finkelstein, R.A., Wood, D.E., 2006. Multilocus sequence typing of historical *Burkholderia pseudomallei* isolates collected in Southeast Asia from 1964 to 1967 provides insight into the epidemiology of melioidosis. J. Clin. Microbiol. 44, 2951–2962.
- Molia, S., Frebling, M., Vachieri, N., Pinarello, V., Petitclerc, M., Rousteau, A., Martinez, D., Lefrançois, T., 2008. *Amblyomma variegatum* in cattle in Marie Galante, French Antilles: prevalence, control measures, and infection by *Ehrlichia ruminantium*. Vet. Parasitol. 153, 338–346.
- Moran, N.A., Mira, A., 2001. The process of genome shrinkage in the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. Genome Biol. 2, 0054.1–0054.12.
- Moran, N.A., Plague, G.R., 2004. Genomic changes following host restriction in bacteria. Curr. Opin. Genet. Dev. 14, 627–633.
- Nei, M., 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia Univ. Press, New York.
- Nei, M., Gojobori, T., 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. Mol. Biol. Evol. 3, 418–426.
- Peter, T.F., Deem, S.L., Barbet, A.F., Norval, R.A., Kimby, B.H., Kelly, P.J., Mahan, S.M., 1995. Development and evaluation of PCR assay for detection of low levels of *Cowdria ruminantium* infection in *Amblyomma* ticks not detected by DNA probe. J. Clin. Microbiol. 33, 166–172.
- Raliniaina, M., Meyer, D., Pinarello, V., Sheikboudou, C., Emboulé, L., Kandassamy, Y., Adakal, H., Stachurski, F., Martinez, D., Lefrançois, T., Vachieri, N., in press. Mining the genetic diversity of *Ehrlichia ruminantium* using map genes family. Vet. Parasitol.
- Reddy, G., Sulsona, C.R., Harrison, R.H., Mahan, S.M., Burrridge, M.J., Barbet, A.F., 1996. Sequence heterogeneity of the major antigenic protein 1 genes from *Cowdria ruminantium* isolates from different geographical areas. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 3, 417–422.
- Rozen, S., Skaletsky, H.J., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (Eds.), Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365–386.
- Sallstrom, B., Andersson, S.G., 2005. Genome reduction in the alpha-Proteobacteria. Curr. Opin. Microbiol. 8, 579–585.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123, 585–595.
- Tamas, I., Klasson, L., Canback, B., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Wernegreen, J.J., Sandstrom, J.P., Moran, N.A., Andersson, S.G.E., 2002. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. Science 296, 2376–2379.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25, 4876–4882.
- Vachieri, N., Maganga, G., Lefrançois, T., Kandassamy, Y., Stachurski, F., Adakal, H., Ferraz, C., Morgat, A., Bensaid, A., Coissac, E., Boyer, F., Demaille, J., Viari, A., Martinez, D., Frutos, R., 2008. Differential strain-specific diagnosis of the heartwater agent: *Ehrlichia ruminantium*. Infect. Genet. Evol. 2008 8, 459–466.
- Van Vliet, A.H., van der Zeijst, B.A., Camus, E., Mahan, S.M., Martinez, D., Jongejan, F., 1995. Use of a specific immunogenic region on the *Cowdria ruminantium* MAP1 protein in a serological assay. J. Clin. Microbiol. 33, 2405–2410.
- Waghela, S.D., Rurangirwa, F.R., Mahan, S.M., Yunker, C.E., Crawford, T.B., Barbet, A.F., Burrridge, M.J., McGuire, T.C., 1991. A cloned DNA probe identifies *Cowdria ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks. J. Clin. Microbiol. 29, 2571–2577.
- Wall, J.D., 1999. Recombination and the power of statistical tests of neutrality. Genet. Res. 74, 65–69.
- Watterson, G.A., 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. Theor. Pop. Biol. 7, 256–276.
- Zweygarth, E., Josemans, A.I., Van Strijp, M.F., Lopez-Rebollar, L., Van Kleef, M., Allsopp, B.A., 2005. An attenuated *Ehrlichia ruminantium* (Welgevonden stock) vaccine protects small ruminants against virulent heartwater challenge. Vaccine 23, 1695–1702.

Tableau XI : Caractéristiques des gènes cibles ainsi que les amorces utilisées pour l'analyse

Locus	Fonction	Rounds en PCR nichée	Nom de l'amorce	Séquence directe (5'-3')	Séquence inverse (5'-3')	T° hybridation	Produit PCR (bp)
<i>gltA</i>	Citrate synthase	1	<i>gltAF1/R1</i>	ATGGGGTTTTCCCTAATGCTGA	CGTGCTATAAAATAGTCATCTT	62	771
		2	F1/R2	ATGGGGTTTTCCCTAATGCTGA	CATCGAGCTGGTCCCCATAAA	62	497
<i>groEL</i>	60 kDa chaperonin	1	<i>groELF1/R1</i>	CACCTGGCACAACACCTTCT	GTGCTTCTCAATGTAACGAT	60	1022
		2	F2/R1	GCTTCACCTTCTACATCCTC	GTGCTTCTCAATGTAACGAT	55	546
<i>lepA</i>	GTP-binding protein	1	<i>lepAF1/R1</i>	GAAGATGTGATAATCCAATGCC	ACTTCCTACCGCTGCCTGTATT	61	766
		2	F2/R1	GGATATGGATTTTCGGTGTGGAT	ACTTCCTACCGCTGCCTGTATT	61	599
<i>lipA</i>	lipoyl synthase	1	<i>lipAF1/R1</i>	TGATCAAATTCCTCTGGAGTAACA	GGTTAAAGGTAAAGATGCCTACAGG	59	732
		2	F2/R2	CTGCCGACCTTAAATCATCCATA	GGATCCTCATGAGCCTCAAA	61	430
<i>lipB</i>	lipoyltransferase	1	<i>lipBF1/R1</i>	CCATATTCTTTGATACCACATGGA	TGGAAGATTGAATCCTTACCTG	58	523
		2	F2/R1	CCATGATATGTTATCCATTTTC	TGGAAGATTGAATCCTTACCTG	58	451
<i>secY</i>	preprotein translocase	1	<i>secyF1/R1</i>	CCTTGATGAAAATTTGCAACAG	CCAGGCATTAATCCAGATGT	58	766
		2	F2/R1	GCGGAACATATGTAGATGCAGT	CCAGGCATTAATCCAGATGT	58	678
<i>sodB</i>	Superoxide dismutase	1	<i>sodBF1/R1</i>	TCTTTGAGATGCAAAATCCC	TGCCAGAACTGCCTTATCAA	58	592
		2	F2/R1	AAGCGTGTTCCAATACATCC	TGCCAGAACTGCCTTATCAA	59	506
<i>sucA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase	1	<i>sucAF1/R1</i>	TGAAAGGCTTTGGCTACAGG	CACCAGGTATAGGTCTACGA	59	1105
		2	F1/R2	TGAAAGGCTTTGGCTACAGG	CCTGACCAATTACAGCAGCA	59	565
<i>clpB</i>	heat-shock protein	1	<i>clpBF1/R1</i>	GACCCCAATGGTTTCTGTGCAT	CTGAGCCAACCTTGTGATGAT	62	774
		2	F2/R1	CTGCTTTTACAGCACTATCC	CTGAGCCAACCTTGTGATGAT	56	713
CDS8580 Inconnue		1	Erga8580F1/R1	CGGATTATTTCTTCACATATAC	ACGATTGTTTATGGCTCAAGGT	58	713
		2	F1/R2	CGGATTATTTCTTCACATATAC	ATGGTGCAATTATTCCGTGA	56	460
<i>map1</i>	major antigenic protein MAP1			(Décrit par Molia et al. 2008)			

6 Conclusions

Les conclusions du travail présenté dans cet article sont de plusieurs ordres. En premier lieu, ce travail a permis de valider une approche de génotypage MLST qui associe des loci polymorphes porteurs d'une information du point de vue de la parcimonie mais aussi un certain nombre de loci beaucoup moins variables et donc informatifs mais permettant de consolider la topologie. Cet ensemble équilibré de loci représente le tout premier schéma MLST pour *E. ruminantium* mais bien plus encore il représente l'outil qui faisait défaut jusqu'à présent pour analyser précisément la diversité génétique d'*E. ruminantium* et caractériser les populations en circulation.

Ce travail initial avait volontairement été réalisé sur un échantillon limité dans le but premier de tester et valider l'approche et une analyse plus avancée des populations en circulation dans la zone d'étude sera présentée plus loin sur un échantillon plus important de souches. Toutefois un des objectifs était d'aborder par l'analyse statistique de la variabilité et du polymorphisme ADN, les notions de plasticité génomique, de recombinaison et de fond génétique des populations. L'existence de mécanismes actifs de plasticité génomique avait déjà été démontrée (Frutos et al., 2006, 2007) mais à partir d'une analyse génomique complète sur un nombre très limité de souches, trois souches de laboratoire dans les faits. Une analyse statistique significative sur un nombre plus important de souches réellement circulantes n'avait pas encore été réalisée. Un des objectifs de ce travail initial était d'aborder cet aspect. Les résultats obtenus à ce niveau, même sur le faible nombre de souches de l'étude préliminaire ont remis en cause un certain nombre d'*a priori* issus d'études partielles et qui étaient jusqu'à présents acceptés sans aucune démonstration réelle.

Le premier *a priori* remis en cause était la circulation d'un grand nombre de populations génétiquement distinctes. Les résultats rapportés ici indiquent plutôt l'existence d'une population ancienne en stase génomique, ce qui correspond au paradigme pour les agents pathogènes intracellulaires (Tamas et al., 2002; Klasson and Andersson, 2004) à partir de laquelle des sous-populations pourraient émerger. Ces résultats remettent aussi en cause l'*a priori* selon lequel les souches antillaises introduites depuis le continent africain il y a 300 à 150 ans et représentées ici

par la souche ERGA seraient des génotypes ancestraux différents des souches circulant actuellement en Afrique (Allsopp et Allsopp, 2007). La grande identité de la souche ERGA avec des souches circulant actuellement au Burkina Faso dans la région de Békuy, la zone d'étude sélectionnée, est un élément indicatif fort d'une situation de stase génomique. Le même raisonnement prévaut pour la souche ERWO est remet en cause la description précédente d'une séparation entre les génotypes ouest africains et sud africains (Alsopp et Alsopp, 2007). Il semble là aussi qu'une homogénéité génotypique existe au contraire de ce qui avait été initialement conclu par les auteurs.

Enfin, le dernier point important mis en évidence par ce travail initial est la présence de recombinaisons et la possible émergence de nouveau génotypes à partir de la population en stase comme par exemple indiqué par les souches 331 et 469. Toutefois le faible nombre de souches impliquées dans ce travail initial de démonstration de concept ne permet pas d'aller beaucoup plus loin dans cette interprétation.

Sous-chapitre 2 : Origine clonale des populations émergentes d'*E. ruminantium*

1 Contexte d'étude

Le travail précédent étant une démonstration de concept basé sur un nombre restreint de souches, il n'est pas possible d'aller très en avant dans l'analyse des processus évolutifs chez *E. ruminantium*. Toutefois, un ensemble d'éléments essentiels sont maintenant réunis : 1) une méthodologie validée de génotypage précis et d'analyse du polymorphisme ADN, 2) un plan d'échantillonnage validé au sein d'une région bien définie, 3) une connaissance de la dynamique des tiques, 4) des informations sur la faible probabilité qu'un élément lié à la dynamique des tiques ne vienne biaiser l'étude de diversité génétique et de profil évolutif, 5) des certitudes sur l'existence de variabilité phénotypiques en termes de protection croisée dans cette même zone.

Il est donc désormais possible de réaliser cette étude de la diversité génétique d'*E. ruminantium* dans un contexte bien contrôlé. A l'issue de cette étape de validation de l'approche MLST, l'analyse a eu lieu sur 37 souches (plus les deux souches de références ERGA et ERWO) pour lesquelles l'amplification a été obtenue pour l'ensemble des 7 gènes cibles désormais retenus. Le nombre de souches, bien que permettant une analyse statistiquement valide reste dans l'absolu relativement faible du fait de la faible prévalence d'*E. ruminantium*, du temps nécessaire à l'échantillonnage (deux ans) et des difficultés techniques dans l'amplification des différents gènes sur l'ensemble des souches qui, ensemble, rendent difficile la conduite d'une analyse sur un plus grand échantillon dans le temps imparti à un travail de thèse.

Les résultats de ce travail sont résumés dans l'article présenté ci-après et qui a été soumis à *Molecular Biology and Evolution*



Clonal origin of emerging populations of *E. ruminantium* in Burkina Faso

Journal:	<i>Molecular Biology and Evolution</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Adakal, Hassane; CIRDES, URBIO Gavotte, Laurent; University Montpellier 2, ISEM Stachurski, Frederic; Cirad, Bios Konkobo, Maurice; CIRDES, URBIO Henri, Helene; Université Lyon 1-CNRS, UMR5558 Zoungrana, Sebastien; CIRDES, URBIO Huber, Karine; INRA-CIRAD, SA Vachier, Nathalie; Cirad, Bios Martinez, Dominique; Cirad, Bios Morand, Serge; CNRS, ISEM Frutos, Roger; CIRAD
Key Words:	<i>Ehrlichia ruminantium</i> , MLST, Phylogeny, Genomic stasis, Emergence, genetic diversity

For

Molecular Biology and Evolution
Research article

Corresponding authors

Roger Frutos
Cirad
UMR 17
TA A-17/G
Campus International de Baillarguet
34398 Montpellier Cedex 5
France
roger.frutos@cirad.fr

Hassane Adakal
CIRDES
Laboratoire de Biotechnologie (URBIO),
559
3-51 Avenue du Gouverneur Louveau
B.P. 454
Bobo-Dioulasso
Burkina Faso
hassaneadakal@yahoo.fr

Clonal origin of emerging populations of *E. ruminantium* in Burkina Faso

Hassane Adakal^{1,2,*}, Laurent Gavotte³, Frédéric Stachurski², Maurice Konkobo¹, Hélène Henri⁴, Sébastien Zoungana¹, Karine Huber², Nathalie Vachier², Dominique Martinez², Serge Morand³ and Roger Frutos^{5*}

- 1) CIRDES Laboratoire de Biotechnologie (URBIO), 559, 3-51 Avenue du Gouverneur Louveau, B.P. 454, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.
- 2) Cirad, UMR15, Cirad-Inra, TA-A15/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France
- 3) UM2, ISEM, UMR 5554, CNRS-UM2-IRD, Université Montpellier 2 CC065, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France
- 4) Université de Lyon, F-69000, Lyon ; Université Lyon 1 ; CNRS, UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622, Villeurbanne, France.
- 5) Cirad, UMR 17, Cirad-Ird, TA-A17/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

*: Co-corresponding authors

Running title: Clonal emergence of *E. ruminantium*

Keywords: *Ehrlichia ruminantium*, MLST, Phylogeny, Genomic stasis, Emergence, Polymorphism, Genetic diversity

Abstract

Cowdriosis or heartwater is a major tick-borne disease on ruminants in Africa and the Caribbean. The causative agent is *Ehrlichia ruminantium*, an intracellular bacterium. Development of vaccines against heartwater has been hampered the limited efficiency of vaccine in the field, thought to be a consequence of the high genetic diversity of strains circulating in a same area. A sampling scheme was set to collect ticks over two years in a delimited area and well identified flock. Prevalence was low at about 3%. A set of 37 strains was considered for MLST analysis using a previously described scheme based on the genes *gltA*, *groEL*, *lepA*, *lipA*, *lipB*, *secY*, *sodB* and *sucA*. Two populations were identified both with limited genetic variability but with differing evolutionary patterns. Population 1 is in genomic stasis, in agreement with the paradigm for intracellular bacteria. The two reference strains, one from the Caribbean separated from West African strains three centuries ago and another one isolated in South Africa, belong to Population 1. Population 2 is on expansion following a recent clonal emergence from Population 1. The founder strain was identified as strain 395. Strain 623 displays and particularly high rate of mutations in *groEL*. Owing to the chaperone function of GroEL, this might indicate another clonal emergence under way. This work brings further insight in the genomic plasticity of *E. ruminantium* and its impact on vaccine strategy.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Introduction

Cowdriosis or heartwater is a tick-borne disease transmitted by *Amblyomma* ticks to domestic and wild ruminants. The bacterial causative agent, *Ehrlichia ruminantium*, is endemic in Subsaharan Africa, in Madagascar, and in some Caribbean islands from where it represents a threat to the American mainland (Barré et al. 1987). In endemic areas, heartwater represents a significant economic problem mostly by preventing introduction of high-yield exotic breeds, limiting thus improvement of livestock production. Several types of vaccines have been developed to counteract the impact of heartwater. However, their field-efficiency was shown to be limited (Collins et al. 2003a, 2003b; Jongejan, 1991; Mahan et al. 2003; Martinez et al. 1994, 1996; Zweygarth et al. 2005; Pretorius et al. 2008). The large diversity of *E. ruminantium* strain observed in a given region was shown to impact cross-protection features (Du Plessis et al. 1989; Adakal et al. 2004) and is thus considered to be responsible for the limited efficacy of vaccines. Assessing genetic diversity and understanding the dynamic of strains evolution and circulation is therefore a key prerequisite for establishing a sound vaccinal strategy. At least part of the genetic diversity is related to the occurrence of recombination (Allsopp and Allsopp, 2007; Adakal et al. 2009). *E. ruminantium* was also shown to undergo active genome size plasticity (Frutos et al. 2006, 2007). The *E. ruminantium* genetic diversity is therefore most likely rather complex and more accurate methods are required for genotyping and monitoring strains circulation. A MLST scheme was recently developed (Adakal et al. 2009) which can discriminate even very closely related strains and allowed accurate monitoring of strains in the field. Using this approach, we report here that field-strains collected over two years in a limited areas of Burkina Faso, correspond to two main populations. We also report that one population currently under expansion has clonally emerged from a more ancient population displaying genomic stasis.

Material and methods

Field collection of ticks and sampling approach. *Amblyomma variegatum* ticks were collected in three villages of Bekuy (3.91° W, 11.60° N), Sara (3.83° W, 11.71° N) and Lamba (4.05° W, 11.66° N). Vegetation in the area consists of bushy and woody savannah and in few places, sparse forest. The climate is marked by two distinct seasons: a rainy season from mid-May to early October and a dry season from November to April. Rainfall is on average 880 mm over the last five years. A longitudinal tick survey was designed to cover the two-year period 2007-2008. Collection periods corresponded to tick activity periods, i.e. rainy season for adult ticks and dry season for nymphs. Adult ticks were thus collected in June, July and August whereas nymphs were collected in October, November and December. During each collection session, all visible ticks were removed from the identified animals. Ticks were then conserved in 70% ethanol for further species identification. Flat *A. variegatum* ticks were stored in alcohol while engorged females were allowed to molt under controlled conditions (27-29°C and 85-90% relative humidity) to the following stage. Out of the twelve collection sessions conducted over the two-year period, a total of 5919 *A. variegatum* ticks were collected out of which 2192 ticks were individually examined for *E. ruminantium* detection.

***E. ruminantium* detection in ticks.** DNA was extracted from individual ticks using the Qiamp DNA extraction kit according to the supplier (Qiagen). Detection of *E. ruminantium* in ticks was conducted by targeting a fragment of *pCS20* gene using a semi-nested PCR (Waghela et al. 1991; Mahan et al. 1992; Peter et al. 1995; Mahan et al. 1998; Martinez et al. 2004; Molia et al. 2008) following conditions previously described (Adakal et al. 2009). Infection rates were used after arcsine transformations of proportions. All data sets were

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

normally distributed (Kolmogorov-Smirnov normality test). ANOVA were used to compare data. These analyses were done using Statview 5.0.1 software (1998, SAS Institute, Inc., Cary, NC).

Target loci and PCR conditions. Selection of MLST loci, i.e. *gltA*, *groEL*, *lepA*, *lipA*, *lipB*, *secY*, *sodB* and *sucA*, has been previously described (Adakal et al. 2009) and was based both on comparative genomic analysis of *E. ruminantium* (Collins et al. 2005; Frutos et al. 2006) and reports of orthologous genes used for MLST analysis on *E. ruminantium* or other pathogens (Allsopp et al. 2003; Allsopp and Allsopp 2007; Harbottle et al. 2006; Inokuma et al. 2001; McCombie et al. 2006; Ahmed et al. 2006). Orthologous genes from the closely related species *Ehrlichia canis* strains Jake (NC_007354), *Ehrlichia chaffeensis* strain Arkansas (NC_007799) were used for outgroup rooting. All primers and PCR conditions are identical to those described in Adakal et al. (2009). PCR products were sequenced by Cogenics (Meylan, France).

Sequence alignment and phylogenetic trees. Multiple sequences were aligned using MUSCLE software (Edgar 2004). Phylogenetic analyses were performed using maximum likelihood (ML) method for each locus separately and for concatenated data set. Jmodeltest (Posada 2008) was used to select the optimal evolution model by evaluating the selected parameters using the Akaike Information Criterion (AIC). A corrected version of the AIC (AICc) was used for each locus separately sequence data set because sample size (n) was small compared with the number of parameters ($n/K < 40$). This approach suggested the following models: *gltA* (TrN+G), *groEL* (HKY+G), *lepA* (HKY+I), *lipA* (HKY+I), *lipB* (TrN+I), *secY* (TPM3uf+G), *sodB* (TrN+I), *sucA* (TPM1uf+G) and the concatenated data set

(GTR+I+G). Under the selected models, the parameters were optimized and ML analyses were performed with phym1 (version 2.4.4) (Guindon and Gascuel 2004). The robustness of nodes was assessed with 100 bootstrap replicates for each locus separately sequences and 1000 boot strap replicates for concatenated data set. Finally, trees were edited using Treedyn (Chevenet et al. 2006).

MLST analyses. Identical DNA sequences at a given locus between strains were arbitrary coded with same allele number (i.e., each allele or haplotype has a unique identifier), following MLST conventions (Urwin and Maiden 2003). Each unique allelic profile was assigned an ST. MLST data were used to construct dendrogram by cluster analysis using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) in the ClonalFrame software package (Didelot and Falush 2007). Consensus MLST tree was built from combined data from three independent runs with 75% majority rule consensus for inference relatedness (program was run with 50 000 burn-in followed by 50 000 subsequent iterations).

Genetic and DNA polymorphism analyses. Genetic similarity and difference matrices were constructed from ClustalX2 alignments using BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999). DNA sequence polymorphism and all subsequent tests were investigated using several functions from the DnaSP 5.00.02 package (Librado and Rozas 2009). Haplotypes (alleles) were calculated according to Nei (1987). Nucleotide diversity, P_i (π), the average number of nucleotide differences per site between two sequences was calculated according to Nei (1987) and using the Jukes and Cantor (1969) correction. Theta (Watterson's mutation parameter) was calculated for the whole sequence from S (Watterson 1975). Eta (η) is the total number of mutations, and S is the number of segregating (polymorphic) sites. K_a (the number of non-

synonymous substitutions per non-synonymous site), and K_s (the number of synonymous substitutions per synonymous site) for any pair of sequences were calculated according to Nei and Gojobori (1986). Tajima's D test (Tajima 1989) was used for testing the hypothesis that all mutations are selectively neutral (Kimura 1983). Other tests of neutrality are Fu and Li's tests D^* and F^* (Fu and Li 1993) and Fu's F_s statistic (Fu 1997). Z_nS statistics (Kelly 1997) is the average of R^2 (Hill and Robertson 1968) over all pairwise comparisons. It reflects excess of linkage disequilibrium compared with that expected under neutrality. Wall's B and Q statistics (Wall 1999) were also considered. Significant pairwise associations were assessed by χ^2 , Fisher exact test and Bonferroni procedure. Divergence between populations was estimated by calculating F_d : the number of fixed differences between populations (Hey 1991), S_m : the number of shared mutations, k the average number of nucleotide differences (Tajima 1983), π : the nucleotide diversity with the Jukes and Cantor correction (Nei 1987; Lynch and Crease 1990), $P1M2$: number of mutations polymorphic in population 1 and monomorphic in population 2, $P2M1$: number of mutations polymorphic in population 2 and monomorphic in population 1, D_{xy} with Jukes and Cantor correction: the average number of nucleotide substitutions per site between populations (Nei 1987) and D_a with Jukes and Cantor correction: the number of net nucleotide substitutions per site between populations (Nei 1987). K , π , S and η were also calculated for each individual population and for the global population.

Search for clonal complexes. *E. ruminantium* strains were analyzed using eBURST software (Feil et al. 2004; Spratt et al 2004). Relationships between strains are predicted descended from the predicted genotype for each group. Results are displayed on a radial diagram. All 39 isolates of *E. ruminantium* were displayed in a single eBURST diagram. The population snapshot provides an overview of the major clonal complex, their predicted founders and

subgroup founders, the small clusters of linked STs, and unlinked STs. The program includes a bootstrap procedure in order to estimate the degree of support for the predicted founder, as well as for subgroup founders. STs that are directly linked differ at only one locus of the eight MLST loci and the abundance of each ST in the input data is represented by the size of the circle representing the ST.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results

Dynamics of *E. ruminantium* infected ticks. Prevalence of *E. ruminantium* in *A. variegatum* according to stage and season was assessed. A total of 2192 *A. variegatum* ticks were collected which were individually checked for the presence of *E. ruminantium* using a pCS20 PCR test. Prevalence was 4.67% in Bekuy (35/750), 3.86% in Lamba (27/699) and 2.42% in Sara (18/743) with an overall infection rate of 3.65% (80/2192). No significant variation was found on tick infection rates according to location. When considering the developmental stage of ticks, no significant variation could be found either with prevalence of 3.02%, 4.38% and 3.27% on female, male and nymphs, respectively.

Identification of haplotypes (alleles) and sequence types (ST). The MLST scheme has been previously described (Adakal et al. 2009) with strain 2 as the reference strain for ST determination. Besides the 37 field strain identified, ERGA and ERWO were added for the analysis. STs and loci polymorphism are presented in Table 1. The overall number of haplotypes identified among the 39 strains analyzed, were 4, 5, 12, 5, 11, 14, 8 and 8 for *gltA*, *groEL*, *lepA*, *lipA*, *lipB*, *secY*, *sodB* and *sucA*, respectively (Table 1). Five haplotypes displayed a higher variability; i.e. *groEL*, *lepA*, *lipB*, *secY* and *sucA*. Among those, *groEL* showed a distinctively high level of variability with a θ value of 9.84.

Haplotype and ST distribution. When using both ST (Fig. 1) and haplotype (Fig. 2a) distribution, the topology of the trees inferred clearly indicated the presence of two genetically distinct populations (Fig. 1 and Fig. 2). When using the closely related species

Ehrlichia chaffeensis (Ec) and *Ehrlichia canis* (Eca) as outgroups (Fig. 2b) the distance between the outgroups and the *E. ruminantium* strains was overwhelmingly higher than those between *E. ruminantium* strains leading thus the superposition of the latter and confirming that all strains analyzed were indeed *E. ruminantium* species. Population 1 comprised 14 strains (2, 623, 629, 630, 631, 635, 668, 708, 1062, 1232, 1267, 1951, ERGA and ERWO) whereas Population 2 comprised 25 strains (19, 331, 395, 461, 463, 466, 469, 474, 476, 810, 891, 903, 1114, 1210, 1270, 1754, 1795, 1796, 1798, 1799, 1905, 1946, 1948, 2165 and 2185). Intra-population distances were smaller within Population 2 than within Population 1. Distances were nevertheless short in both cases, indicative of limited diversity. Strains ERGA and ERWO which originated respectively from Guadeloupe Island and South Africa were both related to population 1, although at different branches. Interestingly all strains in Population 2 seemed to originate from a single parental strain, suggesting the presence of a clonal emergence.

Clonal emergence of Population 2. When analyzing lineage assignment, four clonal complexes were identified, two in population 1 and two in Population 2 (Fig. 3, Table 2). Two complexes were doublets associating strains 2 and 1951 (Population 1) and strains 331 and 469 (Population 2), respectively. A third clonal complex, identified in Population 1, was a triplet associating strains 629, 630 and 635. The last complex comprised only strains from Population 2 and was larger with 19 strains involved (76% of Population 2). The founder strain of this complex was strain 395 which diverged into 4 STs (strains 461, 810 1948 and 2185) and three secondary founders, i.e. strains 463, 1785 and 1905. Strains 1785 evolved in strains 19, 891 and 1799 whereas strains 1905 and 463 gave rise to strain 2165 and the doublet 114 and 1270, respectively. The remaining 13 strains (all determined as Population 1 strains) were all singletons.

Tree topologies and distributions inferred from individual MLST loci. Phylogenetic trees were constructed for each individual MLST locus using both midpoint rooting and outgroup rooting with orthologous sequences from *E. chaffeensis* and *E. canis*. Similar results were obtained for each locus whatever method was used. Therefore, only the midpoint rooting distribution was shown in Supplementary figure 1. With the exception of *groEL* and *lepA*, all tree topologies were congruent in discriminating the same two populations as the concatenated sequences. Although distribution into these two populations was a conserved feature, tree topologies varied from one MLST locus to another. However, when considering *groEL* and *lepA*, this discrimination was not found and members of each population clustered with the other one (Supplementary figure 1b and 1c).

Comparative DNA sequence polymorphism and divergence between populations. DNA polymorphism was investigated separately for the whole population, Population 1 and Population 2 (Supplementary table 1). Strain 623 was already reported as a diverging strain (Adakal et al. 2009) and presented a really singular *groEL* sequence. For all other loci, strain 623 was a member of population 1. Five genes out of eight, i.e. *groEL*, *lepA*, *lipB*, *secY* and *sucA*, supported all the polymorphism observed on both populations whereas the remaining three loci, i.e. *gltA*, *lipA* and *sodB* were highly conserved. DNA polymorphism was rather low in both Population 1 ($\pi=5.1 \times 10^{-3}$) and Population 2 ($\pi=1.7 \times 10^{-3}$) indicative of a limited genetic diversity. However, there was variation on the level polymorphism depending on the loci. The θ (theta) ratio between Populations 1 and 2 was greater than 1 for *gltA* ($\theta=1.185$), *lipB* ($\theta=1.357$) and *sodB* ($\theta=1.186$) and strongly positive for *secY* ($\theta=2.77$) and *sucA* ($\theta=2.019$), indicative of a higher polymorphism in Population 1. On the other hand the ratio was clearly negative for *lepA* ($\theta=0.756$) and *lipA* ($\theta=0.395$) demonstrating a higher variability in Population

2. *GroEL* exemplified a specific situation. When comparing Populations 1 and 1', which differed only by the presence of strain 623 in the former, only *groEL* displayed a variation in polymorphism, all the other loci being similar in both populations. However, the variation in *groEL* polymorphism between Populations 1 and 1' was very high with a θ value going from 14.15 in Population 1 (with strain 623) to 2.256 in Population 1' (without strain 623). This indicates that all the polymorphism which led to the divergence of strain 623 in this work was only borne by the *groEL* locus. DNA polymorphism data for the whole population was, as expected, more important than for the separate populations for six loci out of eight due to the combination of two genetically distinct populations. DNA polymorphism in the whole population, however, decreased for *groEL* and *sucA* which was most likely due to a buffering effect resulting from the important difference between Population 1 and Population 2 for these loci. Divergence data summarized in Supplementary table 2 further evidenced the presence of two genetically distinct populations, notably the distance between intra- and inter-population estimates of variability. The average number of nucleotide difference, k , was clearly higher between populations than within each of them. Similarly, the average number of nucleotide substitutions per site between populations (D_{xy}) was one to two orders of magnitude higher than the value of the nucleotide diversity (π) in each population. The only exception was *lepA* for which there was no significant variation in diversity within and between populations.

Recombination, linkage disequilibrium and selective pressure. As previously reported, although on a limited sample (Adakal et al. 2009), no neutrality test, i.e. Tajima's D , Fu and Li D^* and F^* or Fu's FS , could provide a consistent significant rejection of the neutrality hypothesis on any population subset (data not shown). Recombination events were detected both in Population 1 and Population 2 but the number of events detected was higher in the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

whole population suggesting that recombination might have occurred during the segregation process (data not shown). Linkage disequilibrium provided a complementary insight on the dynamic of evolution of these populations. Significant associations were found but following a differing pattern depending upon populations and loci (Supplementary table 3). With the exception of *gltA* and *lipB*, all loci followed a population-associated pattern. Congruence increased for *groEL*, *lipA*, *sodB* and *sucA* in Population 1 whereas it increased in Population 2 for *lepA* and *secY*.

Discussion

The main problem encountered when controlling *E. ruminantium* is the limited efficiency of vaccines in the field. Such failures are thought to be related to a high genetic diversity among circulating strains. This problem prompted the development of accurate genotyping tools such as the MLST approach previously described (Adakal et al. 2009) and used in this work. Data reported here demonstrate that the situation is more complex than the mere cocirculation of genetically differing populations. The first evidence brought here is that, at least in the selected sampling area, new populations are expanding following clonal emergence. In this work, sampling was conducted over two years, covering thus twice the two developmental stages of ticks (i.e. nymph and adult) in the same area and on the same herds.

The first population described in this work corresponds to strains in stasis, the paradigm for intracellular pathogens. They undergo initial genome size reduction and massive loss of genes during adaptation to the intracellular lifestyle (Moran and Mira 2001; Moran and Plague 2004; Sallstrom and Andersson 2005) and then display a stable genome over long periods of time (Tamas et al. 2002; Klasson and Andersson 2004). Population 1 displays traits in agreement with this paradigm. ERGA and ERWO strains, isolated respectively in Guadeloupe Island in the Caribbean (Uilenberg et al. 1985) and in South Africa (Du Plessis 1985; Collins et al. 2005), appears together with the population 1 strains, indicating first that they are closely related to strains currently circulating in Burkina Faso which contradicts the previous statement that ERGA is a unique genotype accidentally brought to the Caribbean (Allsopp and Allsopp 2007). This also contradicts the existence of a genetic segregation between Southern and Western African strains of *E. ruminantium* and suggests the existence

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

of an old homogenous population throughout the African continent. Furthermore, the significantly higher intra-population distances observed in Population 1 when compared to that of Population 2 is fully compatible with the concept of ancestral population having accumulated mutations and recombination. On the other hand, these distances are in the overall rather limited which, in addition to the presence of ERGA and ERWO, confirms the hypothesis of genomic stasis.

A major conclusion of this work is illustrated by Population 2 which is expanding following clonal emergence from the initial population in stasis (Population 1). This emergence seems to be a recent event and the founder strain (strain 395) of the clonal population can be traced in this work. What triggered this clonal emergence is not known but is most likely to be linked to a high selective pressure creating a bottleneck. As a consequence to this forced adaptation, divergence was fast, as shown by the interpopulational genetic distances, and the population is expanding rapidly. Nothing in the dynamic of ticks over two years could obviously explain this high selective pressure and its nature remains speculative. Similarly, no variation is observed in the prevalence of *Amblyomma* and *E. ruminantium*-infected *Amblyomma* ticks whatever parameter is considered. This suggests that the expansion of Population 2 and its observed increase over the 2-year period is an intrinsic dynamic mechanism in this population. Data do not suggest a replacement of population but instead the co-circulation of the ancestral population in stasis and the emerged clonal population in fast expansion. Data reported here would be in agreement with this hypothesis although there is no indication of what the triggering event and the mechanisms could be. This has to be placed in perspective with previous reports that *E. ruminantium* was characterized by active mechanisms of genome size plasticity and creation/deletion of large tandem repeats (Frutos et al. 2006, 2007). It has been hypothesized that *E. ruminantium* could respond to environmental

stress, such as adaptation to a novel host or to host-defense mechanisms, by accelerated mutations (Frutos et al. 2007, Vachiery et al. 2008).

Strain 623 might be another example of this same phenomenon but at an earlier stage. This strain is similar to the other members of Population 1 for all the loci analyzed with the exception of *groEL* which displays a very high level of diversity. GroEL is a chaperone protein coacting with GroES chaperonin to assist in the folding of newly synthesized proteins and in proper refolding of damaged proteins (Gething and Sambrook 1992; Hartl 1996; Fenton and Horwich, 1997; Ranson et al. 1998). GroEL is capable of processing a wide range of proteins but also to play a storing role under stress and heat-shock conditions (Llorca et al. 1998). GroEL displays a buffering function facilitating the acquisition of neutral genetic diversity and the rate of adaptation. GroEL is therefore playing a key role in bacterial survival and its buffering function has been extended to the adaptation and maintenance of intracellular lifestyle (Moran, 1996; Fares et al. 2002, 2005; Fares and Travers 2006; Tokuriki and Tawfik 2009). Adaptation to intracellular parasitism or symbiosis was accompanied by over expression of *groEL* (Moran 1996). Furthermore, *groEL* was shown to be under positive selection in various lineages of endosymbionts resulting in adaptive evolution to improve the interaction with the unstable endobacteria proteome (Fares et al. 2004). The unusually high diversity rate observed in *groEL* on strain 623 when compared to all the other strains analyzed in this work could be a consequence of over expression and positive selection and could be thus indicative of an adaptive process underway. With this respect, strain 623 might be at the origin of the emergence of a putative Population 3 which could rapidly evolve in clonal way following the scheme observed for Population 2. If this observation falls very well in line with the evolutionary model proposed by Fares et al. (2002; 2004, 2005) experiments in this work were not designed for this purpose and more specific analyses are needed to investigate this

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

hypothesis. In particular, Fares et al. (2005) showed that several regions of *groEL* were under positive selection, especially codons 301 to 316. Unfortunately this region is not covered by the MLST analysis developed here. Full length analysis of the *groEL* gene from representatives of the different lineages described here, in particular strains 623, will thus have to be conducted.

Another question which remains to be addressed is the extent of this stasis/clonal emergence scheme in *E. ruminantium*. Is this phenomenon a local, geographically limited occurrence or is it a general trends in *E. ruminantium* ? This must be addressed now at a larger scale under a well controlled sampling scheme by repeating the approach described here at various locations in Western Africa and throughout the African continent. Investigating this hypothesis is also of very high importance for the sound development of vaccines strategies against heartwater. The existence of locally emerging and fast growing clonal populations might very well explain the reported failure of vaccines in the field. Association data are not available yet but specific investigations must be conducted now to determine whether the specific populations identified here are associated with particular levels of protection, especially a lack of protection. If this field-failure of the current vaccines turns out to be correlated with the local emergence and fast expansion of clonal population, there must be a drastic change in the vaccine strategy against heartwater. In such a situation the current “generic vaccines” approach should be abandoned for a regionally-based approach relying on thorough monitoring of the local populations and their evolutionary patterns, and vaccines should be derived from selected representatives. This new field of investigation is now wide open and the results reported here might not only contribute to the understanding of clonal emergence of intracellular pathogens but also to the development of a novel strategy to control the economically-damaging heartwater in Africa.

PDF Proof: Mol. Biol. Evol.

References

Adakal H, Bada-Alambedji R, Stachurski F. 2004. Etude de la variabilité antigénique d'*Ehrlichia ruminantium* dans la région sud-ouest du Burkina Faso en vue de l'application d'une vaccination. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales* 2:132-137.

Adakal H, Meyer D, Carasco-Lacombe C, Pinarello V, Allègre F, Huber K, Stachurski F, Morand S, Martinez D, Lefrançois T, Vachier N, Frutos R. 2009. MLST scheme of *Ehrlichia ruminantium*: genomic stasis and recombination in strains from Burkina Faso. *Infect. Genet. Evol.* doi:10.1016/j.meegid.2009.08.003

Ahmed N, Devi SM, Valverde M de L, Vijayachar P, Machang'u RS, Ellis WA, Hartskeerl RA. 2006. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5:28. doi:10.1186/1476-0711-5.

Allsopp MT, Van Heerden H, Steyn HC, Allsopp BA. 2003. Phylogenetic relationships among *Ehrlichia ruminantium* isolates. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 990:685-691.

Allsopp MTEP, Allsopp BA. 2007. Extensive genetic recombination occurs in the field between different genotypes of *Ehrlichia ruminantium*. *Vet. Microbiol.* 124:58-65.

Barre N, Uilenberg G, Morel PC, Camus E. 1987. Danger of introducing heartwater onto the American mainland: potential role of indigenous and exotic *Amblyomma* ticks. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 54:406-416.

Chevenet F, Brun C, Bañuls AL, Jacq B and Christen R. 2006. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. BMC Bioinf. 7:439.

Collins NE, Pretorius A, Van Kleef M, Brayton KA, Zwegarth E, Allsopp BA. 2003a. Development of improved vaccines for heartwater. Ann. N. Y. Acad. Sci. 990:474-484.

Collins NE, Pretorius A, van Kleef M, Brayton KA, Allsopp TM, Zwegarth E, Allsopp BA. 2003b. Development of improved attenuated and nucleic acid vaccines for heartwater. Dev. Biol. 114:121-136.

Collins NE, Liebenberg J, De Villiers EP, et al. (22 co-authors). 2005. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable number. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102:838-843.

Didelot X, Falush D. 2007. Inference of bacterial microevolution using multilocus sequence data. Genetics 175:1251–1266.

Du Plessis JL. 1985. A method for determining the *Cowdria ruminantium* infection rate of *Amblyomma hebraeum*: effects in mice injected with tick homogenates. Onderstepoort J. Vet. Res. 52:55–61.

Du Plessis JL, Van Gas L, Olivier JA, Bezuidenhout JD. 1989. The heterogenicity of *Cowdria ruminantium* stocks: cross-immunity and serology in sheep and pathogenicity to mice. Onderstepoort J. Vet. Res 56:195-201.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucl Acids Res. 32:1792-1797.

Ewens WJ. 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles. Theor. Pop. Biol. 3:87-112.

Fares MA, Moya A, Barrio E. 2004. GroEL and the maintenance of bacterial endosymbiosis. Trends Genet. 20:413-416.

Fares MA, Moya A, Barrio E. 2005. Adaptive evolution in GroEL from distantly related endosymbiotic bacteria of insects. J. Evol. Biol. 18:651-660.

Fares MA, Travers SA. 2006. A novel method for detecting intramolecular coevolution: adding a further dimension to selective constraints analyses. Genetics. 173:9-23.

Fares MA, Barrio E, Sabater-Muñoz B, Moya A. 2002. The evolution of the heat-shock protein GroEL from *Buchnera*, the primary endosymbiont of aphids, is governed by positive selection. Mol Biol Evol. 19:1162-1170.

Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J Bacteriol. 186:1518-1530

Fenton WA, Horwich AL. 1997. GroEL-mediated protein folding. Protein Sci. 6:743–760.

- Frutos R, Viari A, Ferraz C, et al. (12 co-authors). 2006. Comparative genomic analysis of three strains of *Ehrlichia ruminantium* reveals an active process of genome size plasticity. J. Bacteriol. 188:2533-2542.
- Frutos R., Viari A, Vachieri N, Boyer F, Martinez D. 2007. *Ehrlichia ruminantium*: genomic and evolutionary features. Trends Parasitol. 23:414-419.
- Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics. 147:915-925.
- Fu YX, Li WH. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics. 133:693-709.
- Gething MJ, Sambrook J. 1992. Protein folding in the cell. Nature 355:33–45.
- Guindon S and Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol. 52:696-704.
- Harbottle H, White DG, McDermott PF, Walker RD, Zhao S. 2006. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. J. Clin. Microbiol. 44:2449-2457.
- Hartl FU. 1996. Molecular chaperone in cellular protein folding. Nature 381:571–580.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Hey J. 1991. The structure of genealogies and the distribution of fixed differences between DNA sequence samples from natural populations. *Genetics*. 128:831-840.

Hill WG, Robertson A. 1968. Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor. Appl. Genet.* 38:226-231.

Inokuma H, Brouqui P, Drancourt M, Raoult D. 2001. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. *J. Clin. Microbiol.* 39:3031-3039.

Jongejan F. 1991. Protective immunity to heartwater (*Cowdria ruminantium* infection) is acquired after vaccination with in vitro-attenuated *Rickettsiae*. *Infect. Immun.* 59:729-731.

Jukes TH, Cantor CR. 1969. Evolution of protein molecules, In Munro HN, editor. *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York. P.21-132.

Kelly JK. 1997. A test of neutrality based on interlocus associations. *Genetics*. 146:1197-1206.

Kimura M. 1983. *The neutral theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.

Klasson L, Andersson SGE. 2004. Evolution of minimal-gene-sets in host-dependent bacteria. *Trends Microbiol.* 12:37-43.

1
2
3 Kurtz A, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, and Salzberg SL.
4
5 2004. Fast Algorithms for Large-scale Genome Alignment and Comparison. *Genome Biol.*
6
7 5:R12.
8
9

10
11
12 Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA
13
14 polymorphism data. *Bioinformatics.* 25:1451-1452.
15
16
17

18
19 Llorca O, Galan A, Carrascosa JL, Muga A, Valpuesta JM. 1998. GroEL under heat-shock.
20
21 Switching from a folding to a storing function. *J. Biol. Chem.* 273:32587–32594.
22
23
24

25
26
27 Lynch M, Crease TJ. 1990. The analysis of population survey data on DNA sequence
28
29 variation. *Mol. Biol. Evol.* 7:377-394.
30
31
32

33
34 Mahan SM, Barbet AF, Burr ridge MJ. 2003. Development of improved vaccines for
35
36 heartwater. *Dev. Biol.* 114:137-145.
37
38
39

40
41 Mahan SM, Waghela SD, McGuire TC, Rurangirwa FR, Wassink LA, Barbet AF. 1992. A
42
43 cloned DNA probe for *Cowdria ruminantium* hybridizes with eight heartwater strains and
44
45 detects infected sheep. *J. Clin. Microbiol.* 30:981-986.
46
47
48

49
50
51 Mahan SM, Peter TF, Simbi BH, Burr ridge MJ. 1998. PCR detection of *Cowdria ruminantium*
52
53 infection in ticks and animals from heartwater-endemic regions of Zimbabwe. *Trop. Vet.*
54
55 Med. 849:85-87.
56
57
58
59
60

Martinez D, Maillard JC, Coisne S, Sheikboudou C, Bensaid A. 1994. Protection of goats against heartwater acquired by immunisation with inactivated elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. Vet. Immunol. Immunopathol. 41:153-163.

Martinez D, Perez JM, Sheikboudou C, Debus A, Bensaid A. 1996. Comparative efficacy of Freund's and Montanide ISA50 adjuvants for the immunisation of goats against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. Vet. Parasitol. 67:175-184.

Martinez D, Vachiery N, Stachurski F, Kandassamy Y, Raliniaina M, Aprelon R, Gueyve A. 2004. Nested PCR for the detection and genotyping of *Ehrlichia ruminantium*. Use in genetic diversity analysis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1026:106-113.

McCombie RL, Finkelstein RA, Wood DE. 2006. Multilocus sequence typing of historical *Burkholderia pseudomallei* isolates collected in Southeast Asia from 1964 to 1967 provides insight into the epidemiology of melioidosis. J. Clin. Microbiol. 44:2951-2962.

Molia S, Frebling M, Vachiery N, Pinarello V, Petitclerc M, Rousteau A, Martinez D, Lefrançois T. 2008. *Amblyomma variegatum* in cattle in Marie Galante, French Antilles: prevalence, control measures, and infection by *Ehrlichia ruminantium*. Vet. Parasitol. 153:338-346.

Moran NA. 1996. Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:2873-2878.

1
2
3 Moran NA, Mira A. 2001. The process of genome shrinkage in the obligate symbiont
4
5 *Buchnera aphidicola*. Genome Biol. 2:0054.1-0054.12.
6
7

8
9
10 Moran NA, Plague GR. 2004. Genomic changes following host restriction in bacteria. Curr.
11
12 Opin. Genet. Dev. 14:627-633
13
14

15
16
17 Nei M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia Univ. Press, New York.
18
19

20
21
22 Nei M, Gojobori T, 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and
23
24 nonsynonymous nucleotide substitutions. Mol. Biol. Evol. 3:418–426.
25
26

27
28
29 Peter TF, Deem SL, Barbet AF, Norval RA, Kimby BH, Kelly PJ, Mahan SM. 1995.
30
31 Development and evaluation of PCR assay for detection of low levels of *Cowdria*
32
33 *ruminantium* infection in *Amblyomma* ticks not detected by DNA probe. J. Clin. Microbiol.
34
35 33:166-172.
36
37

38
39
40 Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Mol Biol Evol. 25:1253-1256.
41
42
43

44
45
46 Pretorius A, van Kleef M, Collins NE, Tshikudo N, Louw E, Faber FE, van Strijp MF,
47
48 Allsopp BA. 2008. A heterologous prime/boost immunization strategy protects against
49
50 virulent *E. ruminantium* needle challenge but not against tick challenge. Vaccine. 26:4363-
51
52 4371.
53
54

55
56
57 Ranson NA, White HE, Saibil HR. 1998. Chaperonins. Biochem. J. 333:233–242.
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Sallstrom B and Andersson SG. 2005. Genome reduction in the alpha-Proteobacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:579-585.

Spratt BG, Hanage WP, Li B, Aanensen DM and Feil EJ. 2004. Displaying the relatedness among isolates of bacterial species -- the eBURST approach. *FEMS Microbiol Lett.* 241:129-34.

Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics.* 105:437-460.

Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutationhypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 123:585-595.

Tamas I, Klasson L, Canback B, Naslund AK, Eriksson AS, Wernegreen JJ, Sandstrom JP, Moran NA, Andersson SGE. 2002. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science.* 296:2376-2379

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25:4876-4882.

Tokuriki N, Tawfik DS. 2009. Chaperonin overexpression promotes genetic variation and enzyme evolution. *Nature.* 459:668-673.

Uilenberg G, Camus E, Barre N. 1985. Some observations on a stock of *Cowdria ruminantium* from Guadeloupe (French West Indies). Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. 34:34-42.

Urwin R, and Maiden MC. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol. 11:479-487.

Vachieri N, Maganga G, Lefrançois T, Kandassamy Y, Stachurski F, Adakal H, Ferraz C, Morgat A, Bensaid A, Coissac E, Boyer F, Demaille J, Viari A, Martinez D, Frutos R. 2008. Differential strain-specific diagnosis of the heartwater agent: *Ehrlichia ruminantium*. Infect. Genet. Evol. 2008. 8:459-466.

Waghela SD, Rurangirwa FR, Mahan SM, Yunker CE, Crawford TB, Barbet AF, Burridge MJ, McGuire TC. 1991. A cloned DNA probe identifies *Cowdria ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks. J. Clin. Microbiol. 29: 2571-2577.

Wall JD. 1999. Recombination and the power of statistical tests of neutrality. Genet. Res. 74:65-69.

Watterson GA 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. Theor. Pop. Biol. 7:256-276.

Zweygarth E, Josemans AI, Van Strijp MF, Lopez-Rebollar L, Van Kleef M, Allsopp BA. 2005. An attenuated *Ehrlichia ruminantium* (Welgevonden stock) vaccine protects small ruminants against virulent heartwater challenge. Vaccine. 23:1695-1702.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

PDF Proof: Mol. Biol. Evol.

Acknowledgements

This work was supported by EC FP6 INCO-DEV grant “Epigenevac” FP6 -003713. H. Adakal was supported by Agence Universitaire pour la Francophonie (AUF) mobility grant program and by mobility grants from CIRAD.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figures legend

Figure 1: MLST dendrogram (UPGMA method) of 39 *E. ruminantium* strains

Figure 2: Maximum likelihood phylogenetic tree of the concatenated MLST loci sequences

Figure 3: eBURST diagram of analyzed *E. ruminantium* strains

Only one major complex was found and the predicted founder was identified as ST395 (blue circle, 96% bootstrap support) and was linked to seven SLVs, two of which have diversified to become subgroup founders (yellow circles).

Table 1. ST scheme and haplotypes distribution

ST type	ST members	Scheme								Frequency	%
		<i>gltA</i>	<i>groEL</i>	<i>lepA</i>	<i>lipA</i>	<i>lipB</i>	<i>secY</i>	<i>sodB</i>	<i>sucA</i>		
395	395, 466, 476, 903	3	5	1	3	6	8	3	5	4	10,26
461	461, 474	3	5	6	3	6	8	3	5	2	5,13
463	463, 1946	4	5	1	3	6	8	3	5	2	5,13
2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,56
1951	1951	1	1	1	1	1	1	8	1	1	2,56
ERGA	ERGA	1	1	3	1	4	1	1	2	1	2,56
1267	1267	1	1	10	1	8	11	2	2	1	2,56
623	623	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2,56
635	635	1	3	1	1	7	1	1	1	1	2,56
630	630	1	3	1	1	7	1	1	6	1	2,56
629	629	1	3	1	1	7	5	1	1	1	2,56
1062	1062	1	3	1	1	8	5	2	7	1	2,56

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

631	631	1	3	2	2	2	9	2	2	1	2,56
668	668	1	3	3	1	3	3	1	3	1	2,56
708	708	1	4	7	1	3	10	1	2	1	2,56
1232	1232	1	4	7	1	3	10	5	8	1	2,56
ERWO	ERWO	2	4	2	1	5	4	1	4	1	2,56
810	810	3	4	1	3	6	8	3	5	1	2,56
331	331	3	4	4	3	6	6	3	5	1	2,56
1795	1795	3	5	1	3	6	7	3	5	1	2,56
2185	2185	3	5	1	3	6	8	3	2	1	2,56
1905	1905	3	5	1	3	6	8	7	5	1	2,56
1754	1754	3	5	1	3	9	13	6	5	1	2,56
1796	1796	3	5	1	3	10	14	3	5	1	2,56
1948	1948	3	5	1	3	11	8	3	5	1	2,56
1798	1798	3	5	1	4	6	7	6	5	1	2,56
2165	2165	3	5	1	5	6	8	7	5	1	2,56
469	469	3	5	4	3	6	6	3	5	1	2,56
19	19	3	5	5	3	6	7	3	5	1	2,56

1210	1210	3	5	9	3	6	7	4	5	1	2,56
1799	1799	3	5	11	3	6	7	3	5	1	2,56
891	891	3	5	12	3	6	7	3	5	1	2,56
1270	1270	4	5	1	3	6	12	3	5	1	2,56
1114	1114	4	5	8	3	6	8	3	5	1	2,56

N Haplotypes	4	5	12	3	11	14	8	8
S	10	44	18	8	20	27	8	17
Size (bp)	395	447	475	341	358	587	415	401
Polymorphism (%)	2,53	9,84	3,79	2,35	5,59	4,60	1,93	4,24

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

Table 2: Clonal complexes among the *E. ruminantium* strains analyzed

Strain ^a	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average ST Bootstrap		
						Distance	Group	Subgroup
Group 1 (19 isolates and 14 STs) ^b								
Predicted Founder: strain 395								
395	4	7	6	0	0	1.46	94%	95%
1795	1	4	7	2	0	1.84	31%	53%
463	2	3	6	4	0	2.07	7%	24%
891	1	3	2	7	1	2.46	1%	11%
19	1	3	2	7	1	2.46	1%	11%
1799	1	3	2	7	1	2.46	1%	11%
1905	1	2	6	5	0	2.23	0%	0%
461	2	1	10	2	0	2.07	0%	0%

1948	1	1	6	6	0	2.38	0%	0%
2185	1	1	6	6	0	2.38	0%	0%
810	1	1	6	6	0	2.38	0%	0%
1270	1	1	3	8	1	2.69	0%	0%
1114	1	1	3	8	1	2.69	0%	0%
2165	1	1	1	6	5	3.15	0%	0%

Group 2 (3 isolates and 3 STs)**Predicted Founder: strain 635**

635	1	2	0	0	0	1.0	34%	0%
630	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
629	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 3 (2 Isolates and 2 STs)**No predicted Founder**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

331	1	1	0	0	0	1.0	NA	NA
-----	---	---	---	---	---	-----	----	----

469	1	1	0	0	0	1.0	NA	NA
-----	---	---	---	---	---	-----	----	----

Group 4 (2 isolates and 2 STs)

No predicted Founder

1951	1	1	0	0	0	1.0	NA	NA
------	---	---	---	---	---	-----	----	----

2	1	1	0	0	0	1.0	NA	NA
---	---	---	---	---	---	-----	----	----

a: Only strains involved in clonal complexes are shown. The remaining 13 strains (i.e. 668, 1267, 1062, 631, 1232, ERWO, ERGA, 708, 1210, 1754, 623; 1798, 1796) are all singletons.

b: The quadruplet 395/466/476/903 and the doublets 461/474 and 463/1946 display the ST represented by strain 395, 461 and 463, respectively.

Supplementary table 1: DNA polymorphism and Ka/Ks assessment**Whole population (39 strains)**

	Size	Haplotype	Hd	θ	η	S	Pa	Si	π	Na	Ns	Ka	Ks	Ka/Ks
<i>gltA</i>	395	4	0.603	2,365	10	10	9	1	0,01099	7	3	0,00464	0,03337	0,136
<i>groEL</i>	447	5	0.614	10,407	47	44	10	34	0,01417	10	37	0,00158	0,05705	0,027
<i>lepA</i>	475	12	0.679	4,257	18	18	10	8	0,00482	9	9	0,00229	0,01370	0,166
<i>lipA</i>	341	5	0.568	1,892	9	8	6	2	0,00770	4	5	0,00275	0,02518	0,107
<i>lipB</i>	358	11	0.676	4,730	20	20	13	7	0,01374	6	13	0,00631	0,03898	0,158
<i>secY</i>	587	14	0.839	6,386	27	27	23	4	0,01637	2	24	0,00173	0,06105	0,027
<i>sodB</i>	415	8	0.695	1,892	8	8	6	2	0,00511	2	3	0,00285	0,01379	0,205
<i>sucA</i>	401	8	0.599	4,021	17	17	12	5	0,01333	8	9	0,00424	0,04399	0,094

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

Population 1 (13 strains)

	Size	Haplotype	Hd	θ	η	S	Pa	Si	π	Na	Ns	Ka	Ks	Ka/Ks
<i>gltA</i>	395	2	0,154	0,322	1	1	0	1	0,00039	0	1	0,00000	0,00174	0,000
<i>groEL</i>	447	3	0.614	2,256	7	7	7	0	0,00757	0	7	0,00000	0,03452	0,000
<i>lepA</i>	475	5	0,769	2,256	7	7	7	0	0,00637	1	6	0,00146	0,02358	0,061
<i>lipA</i>	341	2	0,154	0,322	1	1	0	1	0,00045	1	0	0,00058	0,00000	NA
<i>lipB</i>	358	7	0,897	2,578	8	8	7	1	0,00910	0	8	0,00000	0,04069	0,000
<i>secY</i>	587	7	0,846	4,511	14	14	10	4	0,00664	1	13	0,00086	0,02577	0,033
<i>sodB</i>	415	4	0,603	0,967	3	3	1	2	0,00167	2	1	0,00051	0,00469	0,109
<i>sucA</i>	401	7	0,846	5,478	17	17	3	14	0,00838	8	9	0,00442	0,02181	0,200

Population 1' (14 strains)

	Size	Haplotype	Hd	θ	η	S	Pa	Si	π	Na	Ns	Ka	Ks	Ka/Ks
<i>gltA</i>	395	2	0,143	0,314	1	1	0	1	0,00036	0	1	0,00000	0,00161	0,000
<i>groEL</i>	447	4	0,692	14,15	45	43	7	36	0,01950	10	35	0,00448	0,07309	0,058
<i>lepA</i>	475	5	0,780	2,201	7	7	7	0	0,00625	1	6	0,00143	0,02312	0,061
<i>lipA</i>	341	2	0,264	0,314	1	1	1	0	0,00077	1	0	0,00100	0,00000	NA
<i>lipB</i>	358	7	0,901	2,516	8	8	8	0	0,00930	0	8	0,00000	0,04161	0,000
<i>secY</i>	587	8	0,868	4,402	14	14	10	4	0,00758	1	13	0,00098	0,02942	0,033
<i>sodB</i>	415	4	0,626	0,943	3	3	1	2	0,00175	2	1	0,00088	0,00504	0,175
<i>sucA</i>	401	7	0,824	5,346	17	17	3	14	0,00789	8	9	0,00411	0,02073	0,196

Population 2 (25 strains)

	Size	Haplotype	Hd	θ	η	S	Pa	Si	π	Na	Ns	Ka	Ks	Ka/Ks
<i>gltA</i>	395	2	0,280	0,265	1	1	1	0	0,00071	0	1	0,00000	0,00322	0,000
<i>groEL</i>	447	2	0,153	2,384	9	9	9	0	0,00309	0	9	0,00000	0,01417	0,000
<i>lepA</i>	475	8	0,593	2,913	11	11	3	8	0,00232	3	8	0,00202	0,00309	0,653
<i>lipA</i>	341	3	0,157	0,795	3	3	1	2	0,00092	2	1	0,00089	0,00106	0,835
<i>lipB</i>	358	3	0,157	1,854	6	6	0	6	0,00134	3	3	0,00130	0,00150	0,866
<i>secY</i>	587	6	0,643	1,589	6	6	3	3	0,00182	1	5	0,00049	0,00616	0,079
<i>sodB</i>	415	4	0,360	0,795	3	3	2	1	0,00153	3	0	0,00165	0,00115	1,430
<i>sucA</i>	401	2	0,080	2,648	10	10	0	10	0,00200	2	8	0,00054	0,00723	0,075

S: Polymorphic sites

η: Total number of mutations

θ: Watterson’s mutation parameter (per sequence from S

π: Nucleotide diversity

Hd: Haplotype diversity

Pa: Parsimony indicative sites

Si: Number of singletons

Na: Number of non-synonymous substitutions

Ns: Number of synonymous substitutions

Ka: Rate of non-synonymous substitutions

Ks: Rate of synonymous substitutions

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

Supplementary table 2: Divergence between populations

Locus	Whole population (39 strains)				Population 1 (14 strains)				Population 2 (25 strains)				Population 1 / Population 2						
	S	η	k	π	S	η	k	π	S	η	k	π	Fd	Sm	P1M2	P2M1	k	Dxy	Da
gltA	10	10	4,340	0.01099	1	1	0.143	0.00036	1	1	0.280	0.00071	8	0	1	1	8,911	0.02256	0.02203
groEL	44	47	6,115	0,01368	43	45	8,714	0,02042	9	9	1.380	0.00313	0	7	38	2	9,497	0,02186	0,01009
lepA	18	18	2.289	0.00482	7	7	2,967	0,00628	11	11	1.100	0.00232	0	0	7	11	3.131	0.00664	0.00231
lipA	8	9	2.626	0.00770	1	1	0.264	0.00077	3	3	0.313	0.00056	5	0	1	3	5.223	0.01548	0.01463
lipB	20	20	4.918	0.01374	8	8	3.330	0.00938	7	7	0.560	0.00157	5	0	8	7	9.066	0.02577	0.02030
secY	27	27	9.611	0.01637	14	14	4.451	0.00765	6	6	1.067	0.00182	10	3	11	3	18.277	0.03181	0.02707
sodB	8	8	2.121	0.00511	3	3	0.725	0.00175	3	3	.0633	0.00153	3	1	2	2	3.760	0.00912	0.00748
sucA	17	17	5.347	0.01333	17	17	3.165	0.00800	10	10	0.800	0.00203	0	10	7	0	9.811	0.02492	0.01991

Locus	Whole population (38 strains)				Population 1' (13 strains)				Population 2 (25 strains)				Population 1' / Population 2						
	S	η	k	π	S	η	k	π	S	η	k	π	Fd	Sm	P1M2	P2M1	k	Dxy	Da
gltA	10	10	4.259	0.01078	1	1	0.154	0.00039	1	1	0.280	0.00071	8	0	1	1	8,917	0.02292	0.02237
groEL	10	10	4.235	0.00947	7	7	3.385	0.00764	9	9	1.380	0.00313	0	6	1	3	7.074	0.01602	0.01063
lepA	18	18	2.202	0.00464	7	7	3.026	0.00641	11	11	1.100	0.00232	0	0	7	11	3.022	0.00641	0.00204
lipA	8	9	2.535	0.00743	1	1	0.154	0.00045	3	3	0.313	0.00056	5	0	1	3	5.157	0.01528	0.01459
lipB	20	20	4.748	0.01326	8	8	3.256	0.00917	7	7	0.560	0.00157	5	0	8	7	8.972	0.02550	0.02013
secY	27	27	9.405	0.01602	14	14	3.897	0.00670	6	6	1.067	0.00182	10	3	11	3	18.425	0.03207	0.02781
sodB	8	8	2.064	0.00497	3	3	0.692	0.00167	3	3	.0633	0.00153	3	1	2	2	3.714	0.00901	0.00740
sucA	17	17	5.257	0.01311	17	17	3.359	0.00849	10	10	0.800	0.00203	0	10	7	0	9.828	0.02496	0.01932

η : Number of mutations

k: Average number of nucleotide differences

π : Nucleotide diversity

Fd: Number of fixed differences

Sm: Number of shared mutations

P1M2: Mutations polymorphic in population 1, but monomorphic in population 2

P2M1: Mutations polymorphic in population 2, but monomorphic in population 1

Dxy: Average number of nucleotide substitutions per site between populations

Da: Number of net nucleotide substitutions per site between populations

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

Supplementary table 3: Assessment of Linkage disequilibrium

	Whole population (39 strains)						Population 1 (14 strains) ^a						Population 1' (13 strains) ^b						Population 2 (25 trains)					
	ZnS	B	Q	PW	χ^2	F	ZnS	B	Q	PW	χ^2	F	ZnS	B	Q	PW	χ^2	F	ZnS	B	Q	PW	χ^2	F
<i>gltA</i>	0.7474	0.6667	0.7000	45	36 ⁽³⁶⁾	36 ⁽³⁶⁾	NA	NA	NA	0	0	0	NA	NA	NA	0	0	0	NA	NA	NA	0	0	0
<i>groEL</i>	0.7101	0.6750	0.6750	820	612 ⁽⁵⁷⁵⁾	578 ⁽¹²⁾	0.7949	0.7500	0.7561	820	640 ⁽⁰⁾	7 ⁽⁰⁾	0.7707	0.8333	1.0000	21	21 ⁽¹¹⁾	21 ⁽¹¹⁾	1.0000	1.0000	1.0000	36	36 ⁽⁰⁾	36 ⁽⁰⁾
<i>lepA</i>	0.0943	0.0588	0.1111	153	24 ⁽¹⁵⁾	22 ⁽⁶⁾	0,3258	0,1667	0,2857	21	8 ⁽³⁾	7 ⁽³⁾	0.3412	0.1667	0.2857	21	8 ⁽³⁾	4 ⁽³⁾	0.1109	0.1000	0.1818	5	7 ⁽⁷⁾	5 ⁽⁰⁾
<i>lipA</i>	0.3099	0.1667	0.2857	21	6 ⁽⁶⁾	6 ⁽⁶⁾	NA	NA	NA	0	0	0	NA	NA	NA	0	0	0	0.3200	0.0000	0.0000	3	2 ⁽⁰⁾	0
<i>lipB</i>	0.2021	0.2105	0.3500	190	63 ⁽⁴³⁾	59 ⁽³⁴⁾	0.2433	0.2857	0.5000	28	9 ⁽²⁾	4 ⁽¹⁾	0.2246	0.2857	0.5000	28	8 ⁽²⁾	4 ⁽¹⁾	0.2870	0.5000	0.7143	21	6 ⁽⁶⁾	6 ⁽⁰⁾
<i>secY</i>	0.3985	0.1923	0.2593	351	210 ⁽¹⁵²⁾	200 ⁽¹⁴⁷⁾	0,3352	0,1538	0,2143	91	37 ⁽²³⁾	21 ⁽⁰⁾	0.3613	0.1538	0.2143	91	38 ⁽²³⁾	21 ⁽⁰⁾	0.1786	0.0000	0.0000	15	4 ⁽⁴⁾	1 ⁽⁰⁾
<i>sodB</i>	0.1781	0.1429	0.2500	28	9 ⁽⁵⁾	7 ⁽³⁾	0.0190	0.0000	0.0000	3	0	0	0,0225	0,0000	0,0000	3	0	0	0.3392	0.0000	0.0000	3	3 ⁽²⁾	1 ⁽¹⁾
<i>sucA</i>	0.3814	0.1875	0.2353	136	61 ⁽⁵⁶⁾	57 ⁽⁵⁴⁾	0.3819	0.1875	0.2353	136	59 ⁽⁴⁶⁾	1 ⁽⁰⁾	0.3836	0.1875	0.2353	136	48 ⁽⁴⁶⁾	1 ⁽⁰⁾	1.0000	1.0000	1.0000	45	45 ⁽⁴⁵⁾	45 ⁽⁰⁾

ZnS: ZnS statistic (Kelly 1997).

B: Wall's B statistics (Wall, 1999)

Q: Wall's Q statistics (Wall, 1999)

PW: Number of pairwise comparisons

χ^2 : Number of significant associations tested by chi-square test

F: Number of significant associations tested by a fisher exact test

*: Significant associations confirmed by the Bonferroni procedure

PDF Proof: Mol. Biol. Evol.

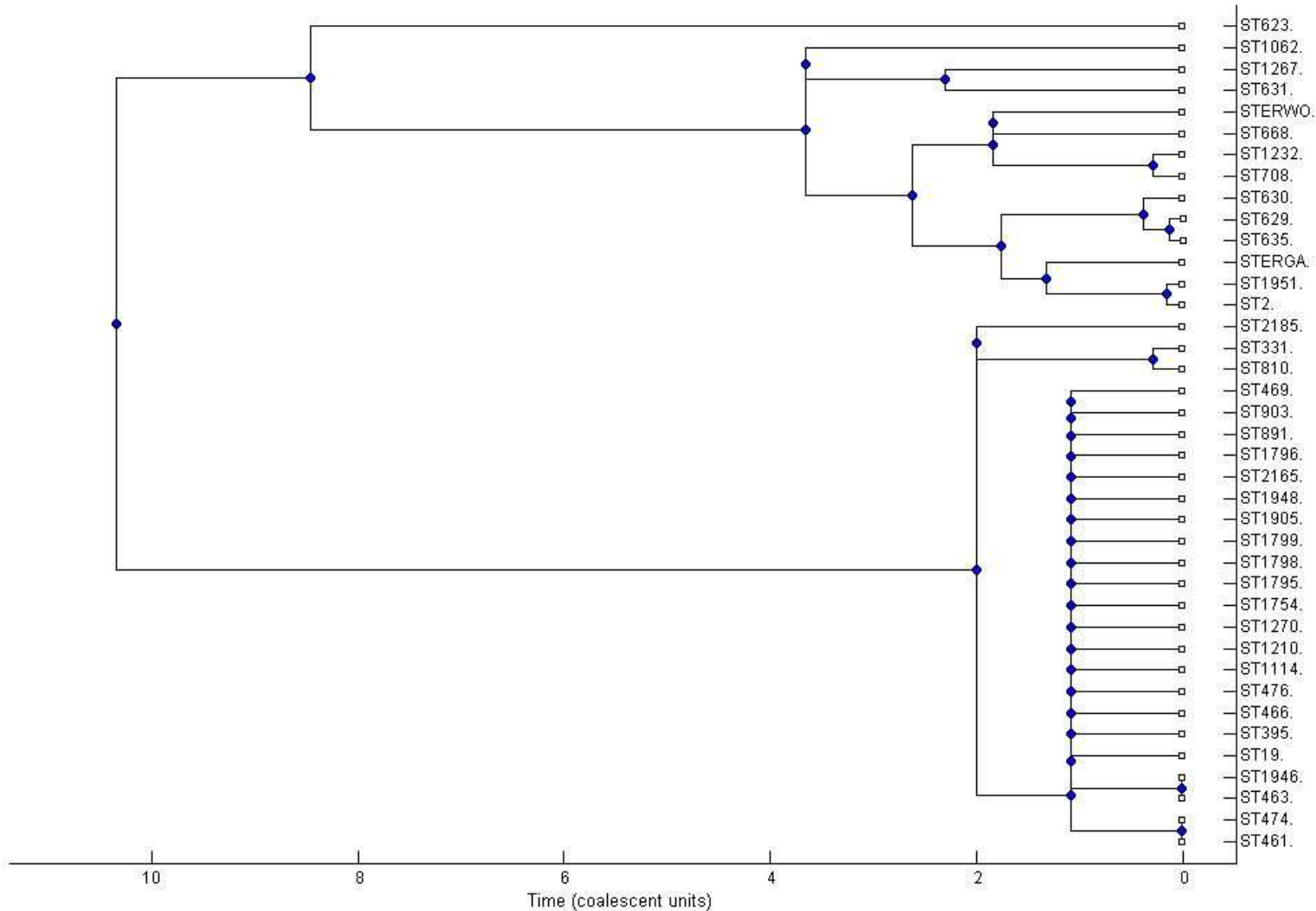


Figure 1

PDF Proof: Mol. Biol. Evol.

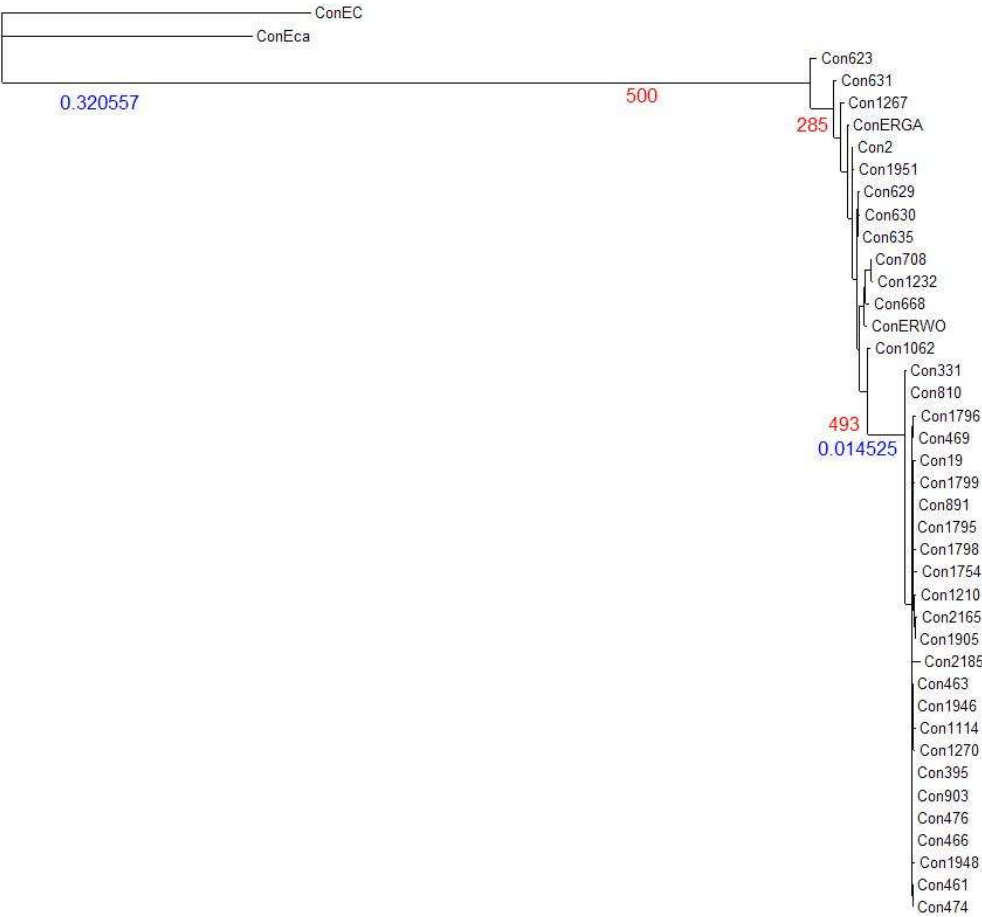


Figure 2

PDF Proof: Mol. Biol. Evol.

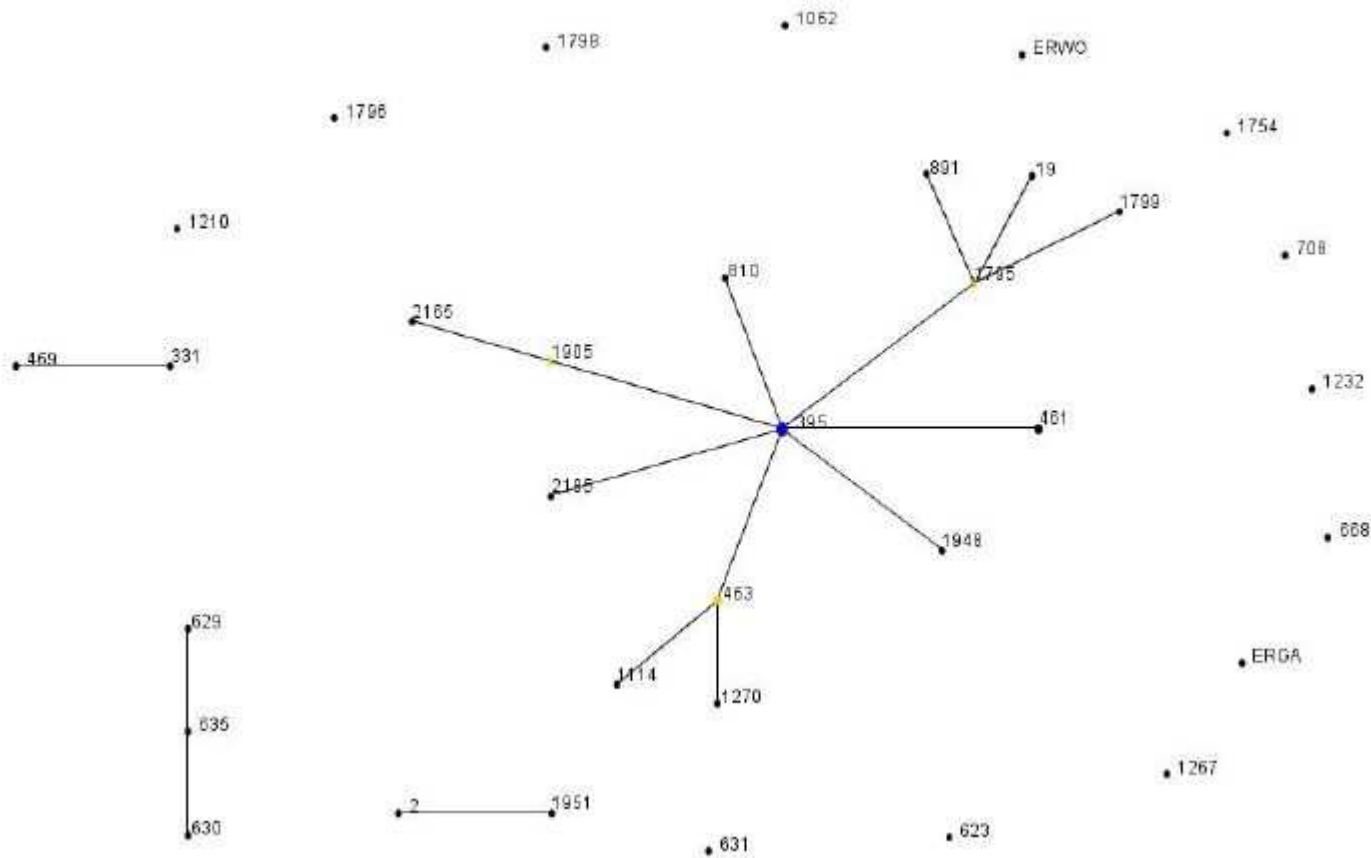


Figure 3

A - gltA

B - lepA

C - lepA

D - groEL

E - lepA

F - secY

Supplementary figure 1

G - sodB

H - sucA

2 Conclusions

Les résultats présentés dans cet article confirment les tendances observées avec l'échantillon réduit et montrent que la situation est plus complexe qu'imaginée initialement du point de vue de la gestion des stratégies vaccinales. La conclusion principale de ce travail est qu'au moins dans la région de Békuy qui a été sélectionnée pour cette étude, il y a deux populations d'*E. ruminantium*. Une première population plus ancienne est en stase génomique et, au moins sur la base des séquences analysées, homologue aux souches antillaises et sud africaines.

La seconde population a émergé de la première, et ce de façon clonale, et est actuellement en expansion. Cette émergence semble récente avec une souche fondatrice, la souche 395, pouvant être identifiée. Ceci indique plus encore le phénomène d'expansion associé à cette population. Le mécanisme ayant engendré cette situation d'émergence clonale et d'expansion est encore inconnu mais ce que les données de polymorphisme montrent c'est une grande divergence interpopulationnelle confirmant d'un côté le caractère statique du point de vue génomique de la population d'origine et le caractère clonal de la population émergente. Une hypothèse raisonnable serait un goulet d'étranglement ayant forcé une adaptation rapide. Rien dans la dynamique des tiques ou du bétail ne pouvant expliquer cela, une solution serait à rechercher dans les réservoirs sauvages mais cela demeure purement spéculatif à ce stade.

Un autre aspect mis en évidence par ces résultats est illustré par la souche 623 qui pourrait fort bien représenter une autre population en émergence clonale mais à un stade plus précoce. Au delà des divers aspects précis discutés dans l'article, le point majeur de discussion est de savoir si ce phénomène d'émergence clonal est une situation locale mise en évidence ponctuellement ou bien un mécanisme plus général chez *E. ruminantium*. Il est essentiel de répondre à cette question car cela conditionne complètement le développement de la stratégie vaccinale à mettre en oeuvre.

Le premier prolongement de ces résultats est le génotypage MLST actuellement des souches décrites dans le chapitre 1 (les souches Bankouma 421, Bekuy 242, Bekuy 255, Lamba 479, Lamba 465, Sara 292 et Sara 445) qui ont fait l'objet de tests vaccinaux afin d'associer un

génotype donné à un degré de protection croisée. Au delà de ce premier objectif, l'outil présenté ici devra être utilisé à une échelle plus grande, nationale, régionale et continentale, et selon un plan d'échantillonnage précis pour vérifier si ce mécanisme est général et définir en conséquence des stratégies vaccinales pertinentes. Cet aspect sera évoqué dans la partie suivante qui est la conclusion de ce travail de thèse.

Conclusion générale

Au terme de ce travail de thèse, nous pouvons conclure que les principaux résultats obtenus contribuent à une meilleure connaissance de l'épidémiologie de la cowdriose, nécessaire à la mise en place de moyens de lutte efficaces.

*Contribution à l'évaluation du potentiel vaccinal des souches « génériques » et des souches locales d'*E. ruminantium* pour le développement de vaccin contre la cowdriose*

Le chapitre introductif de la thèse (**chapitre 1**) a mis en évidence l'intérêt du choix des souches vaccinales pour atteindre des niveaux de protection acceptable. L'analyse préalable de l'efficacité comparée de Gardel et de Welgevonden a permis de choisir Gardel comme souche vaccinale. Et lorsqu'on lui adjoint une souche locale, la protection augmente de manière significative et laisse penser que les nouvelles orientations de recherche de vaccins contre la cowdriose doivent être orientées vers l'exploration des souches locales pour la production de vaccins régionaux voire locaux.

*Contribution à l'analyse de la diversité génétique d'*E. ruminantium**

La nécessité première avant tout développement de vaccins est de mieux comprendre la dynamique de ces souches d'*E. ruminantium* et surtout des souches locales et de mieux caractériser les mécanismes en jeu par l'utilisation de méthodes plus fines et plus appropriées.

Le schéma MLST développé dans le **chapitre 5** représente l'outil qui faisait défaut jusqu'à présent pour analyser précisément la diversité génétique d'*E. ruminantium* et caractériser les populations en circulation.

La puissance de l'outil a permis de mettre en évidence que dans la zone de Békuy qui a été sélectionnée pour cette étude, il y a au moins deux populations d'*E. ruminantium*. Une première population plus ancienne qui est en stase génomique et une seconde population qui a émergé de la première de façon clonale. Cette dernière est actuellement en expansion. Seul un plan d'échantillonnage au niveau local, tel que défini dans le **chapitre 4** de cette thèse,

pouvait permettre d'aboutir à de tels résultats qui, à présent, serviront de base pour envisager une analyse au niveau global.

Contribution au développement de méthodes de contrôle du vecteur A. variegatum

Après avoir présenté dans le **chapitre 2**, les moyens de lutte couramment utilisés par les éleveurs du Burkina Faso et le niveau de résistance des tiques sur le terrain, nous avons décrit dans le **chapitre 3**, une méthode de lutte contre les adultes d'*A. variegatum* qui est moins dispendieuse d'acaricide, donc plus respectueuse de l'environnement. Couplée à l'utilisation du pédiluve acaricide déjà en vigueur au Burkina Faso, l'exécution d'une telle méthode intégrée devrait permettre une limitation de l'infestation des animaux par *A. variegatum* et par l'ensemble des autres espèces de tiques à un niveau tel que l'état de stabilité enzootique soit une réalité sur le terrain. Les facteurs déterminants de cette stabilité enzootique, dont le concept reste encore très théorique, devraient être évalués par une approche multidisciplinaire.

Perspectives

Les perspectives que nous proposons ici sont les voies de recherche dans lesquelles nous souhaitons poursuivre nos activités de recherche au CIRDES. Certaines parmi elles ont déjà fait l'objet de protocoles de recherche élaborés, soumis à des bailleurs pour financement, en partenariat avec des institutions du Nord. Mais à ce jour, aucun des projets soumis n'a accueilli les faveurs des évaluateurs.

1 Développement de vaccin local contre la cowdriose

Comme première action de recherche à conduire à l'issue de ce travail de thèse, nous souhaitons immédiatement appliquer le schéma MLST développé ici aux souches d'*E. ruminantium* isolées au CIRDES en 2002-2004 lors des essais vaccinaux et conservées dans une cryothèque. Ces souches, comme décrit dans le chapitre 1 de la thèse, ont fait l'objet de tests de protection croisée. Ceux-ci ne sont pas exhaustifs et mériteraient d'être complétés afin d'explorer le potentiel vaccinal de certaines de ces souches dont les premiers résultats de protection croisée semblent encourageants. L'application du schéma MLST sera étendue à des souches du Bénin et du Mali afin de préciser si la stase et l'expansion clonale observées chez les populations d'*E. ruminantium* du Burkina Faso serait un phénomène local, donc propre aux souches étudiées dans le cadre de cette thèse, ou s'il s'agit d'un phénomène global.

Le détail de la démarche que nous comptons adopter pour réaliser ces activités est donné dans un protocole de recherche soumis en Septembre 2009 à un appel d'offre à projets lancé par l'Agence Universitaire pour la Francophonie (AUF). Nous le présentons tel que soumis dans les annexes.

2 Le développement des méthodes de lutte contre les tiques, complémentaires des méthodes existantes

Nous avons vu dans le second chapitre de la thèse que les méthodes courantes de lutte utilisées par les éleveurs traditionnels ne respectent pas les recommandations minimales qui puissent

garantir un contrôle efficace des tiques. Le pédiluve acaricide développé au CIRDES par Frédéric Stachurski a été proposé aux différents types de systèmes d'élevage du Burkina Faso comme méthode intégrée de lutte contre les tiques et les glossines. Sa diffusion s'est faite jusque-là à travers des projets de développement d'une durée de 5 ans maximum. A la fin de ces projets, une bonne partie des pédiluves a pratiquement été abandonnée, les éleveurs ne trouvant pas la méthode satisfaisante. Nous pensons que les raisons des échecs doivent être profondément étudiées dans un cadre multidisciplinaire car la méthode en tant que telle est efficace. Une occasion de discuter des facteurs d'adoption du pédiluve est l'atelier financé par le CIRAD et qu'organisera le CIRDES en Décembre 2009 à Ouagadougou sur le thème « *Evaluation des impacts des innovations dans les systèmes de production et les territoires agropastoraux d'Afrique de l'Ouest : quelles méthodes, quels indicateurs ?* ».

Par ailleurs, la gestion des déplacements des troupeaux pour limiter l'infestation par les adultes d'*A. variegatum*, développée dans le chapitre 3 de la thèse, devra être mise en pratique à l'échelle d'un troupeau expérimental qui utiliserait déjà le pédiluve pour évaluer la complémentarité des deux méthodes et évaluer à quel niveau la limitation de l'usage des acaricides est possible au cours de l'année pour assurer une infestation minimale compatible avec une productivité satisfaisante.

3 La surveillance de l'expansion de *Boophilus microplus* en Afrique de l'Ouest

Le troisième axe de recherche, dont la pertinence ne découle certes pas directement de résultats de cette thèse, serait de clarifier la situation de l'existence de *Boophilus microplus* en Afrique de l'Ouest : cette tique est-elle présente seulement dans les villages/départements de la Côte d'Ivoire et du Bénin où des spécimens ont été trouvés ou est-elle présente aussi dans d'autres pays de l'Afrique de l'Ouest où il y a eu importation de bétail sur pied en provenance de pays comme le Brésil ? Quelles sont les capacités d'expansion et de colonisation de nouveaux territoires par la tique à partir du noyau identifié dans ces deux pays ? Quelles sont les relations génétiques qui existent entre ces spécimens et des populations de zones où la résistance des tiques *Boophilus* est avérée ? Les spécimens trouvés sont-ils invasifs et capables de déplacer/remplacer les autres espèces de *Boophilus* spp « autochtones » ? Ce sont autant de questions que nous aurions pu aborder au travers d'un projet soumis à un appel à projets britannique CIDLID, en collaboration

avec l'IRD de Montpellier, l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers, l'Université d'Edinburgh, l'Université d'Utrecht, l'Université d'Abomey Calavi du Bénin, le LANADA en Côte d'Ivoire, la Direction des services vétérinaires du Ghana. Malgré le fait que le projet ait été jugé excellent par les évaluateurs, il n'a pas été sélectionné pour recevoir de financement. Nonobstant, il est impératif de poursuivre la recherche de financement pour mener une action de contrôle et de surveillance, la tique étant déjà présente dans la sous-région, avec tous les risques que cela comporte.

En effet, le principal problème que pourrait engendrer l'expansion de *Boophilus microplus* en Afrique de l'Ouest est la modification de l'épidémiologie de deux autres maladies majeures transmises par les tiques à savoir les babésioses et les anaplasmoses. En attendant de connaître l'étendue de la prévalence de cette tique dans la sous-région, il serait prévoyant de bien définir l'incidence et la prévalence de ces maladies pour lesquelles, et nous le répétons, on estime à tort qu'il existe une stabilité enzootique. Du 7 au 12 Décembre 2009, nous participerons à un atelier de formation sur les tiques et maladies associées, organisé par l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat. A cette occasion, il ne sera pas seulement question d'apprentissage des méthodes de diagnostic des maladies à tiques, mais également de discuter de futures collaborations dans ce domaine.

4 L'étude de la résistance des tiques aux acaricides en Afrique de l'Ouest

L'étude pilote réalisée au Burkina Faso et qui a été décrite dans le chapitre 2 a montré que les produits acaricides conventionnels présents sur le marché, abstraction faite de tout mésusage, sont encore efficaces pour contrôler l'infestation par les tiques et qu'il n'existerait pas de problèmes de résistance aux acaricides. Mais l'usage de plus en plus grandissant de produits acaricides conduira inéluctablement à la sélection de tiques résistantes sur le terrain si on n'y prend pas garde. Doublié de cela, la présence de spécimens de *Boophilus microplus* parmi lesquels on craint d'avoir des individus déjà résistants, oblige à mettre en place un système de surveillance et de vigilance de la résistance. Le CIRDES de ce point de vue, dispose d'un laboratoire et de l'expertise suffisante pour conduire les tests de diagnostic de la résistance et servir de laboratoire de surveillance pour la sous-région.

Références bibliographiques

1. Atlas du Burkina Faso (1998). Les Atlas "Jeune Afrique". Editions du Jaguar, Paris. p. 62, 3ème Edition. .
2. Achtman, M., Pluschke, G., 1986, Clonal analysis of descent and virulence among selected *E. coli*. Annu Rev Microbiol 40, 185-210.
3. Adakal, H., 2004. Utilisation des techniques nested PCR et RFLP pour la détection et la caractérisation génétique d'*Ehrlichia ruminantium* au Burkina Faso. Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie Animale. UCAD, Dakar 66 pp. 66.
4. Alexander, R.A., 1931, Heartwater. The present state of our knowledge of the disease., In: 17th Report of the Director of Veterinary Services and Animal Industry, Union of South Africa. pp. 89-150.
5. Allsopp, B.A., 2009, Natural history of *Ehrlichia ruminantium*. Vet Parasitol, doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.014.
6. Allsopp, B.A., Allsopp, M.T.E.P., Du Plessis, J.L., E.S, V., 1996, Uncharacterised *Ehrlichia* spp. may contribute to clinical heartwater. Ann. NY. Acad. Sci. 791, 17-24.
7. Allsopp, M.T., Louw, M., Meyer, E. C., 2005, *Ehrlichia ruminantium*: An Emerging Human Pathogen? . Ann N Y Acad Sci 1063, 358-360.
8. Allsopp, M.T.E.P., Allsopp, B.A., 2007, Extensive genetic recombination occurs in the field between different genotypes of *Ehrlichia ruminantium*. Vet. Microbiol. 124, 58-65.
9. Andrew, H.R., Norval, R.A.I., 1989, The carrier status of sheep, cattle, and African buffalo recovered from heartwater. Vet. Parasitol. 34, 261-266.
10. Baker, J.A.F., Joordan, J.O., Robertson, W.D., 1979, Ixodicidal resistance in *Boophilus microplus* (Canestrini) in the Republic of South Africa and Transkei. JI S. Afr. vet. med. Assoc. 50, 296-310.
11. Barré, N., Uilenberg, G., Morel, P.-C., Camus, E., 1987, Danger of introducing heartwater onto the American mainland: potential role of indigenous and exotic *Amblyomma* ticks. Onderstepoort J. vet. Res. 54, 405-417.
12. Bekker, C.P.J., de Vos, S., Taoufik, O., Sparagano, O.A.E., Jongejan, F., 2002, Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. Vet. Microbiol. 89, 223-238.
13. Bekker, C.P.J., Postigo, M., Taoufik, A., Bell-Sakyi, L., Ferraz, C., Martinez, D., Jongejan, F., 2005, Transcription analysis of the major antigenic protein 1 multigene family of three in vitro cultured *Ehrlichia ruminantium* isolates. J. Bacteriol. 187, 4782-4791.
14. Bell-Sakyi, L., 2004, *Ehrlichia ruminantium* grows in cell lines from four ixodid tick genera. J Comp Pathol 130, 285-293.

15. Bell-Sakyi, L., Koney, E.B.M., Dogbey, O., Walker, A.R., 2004, *Ehrlichia ruminantium* seroprevalence in domestic ruminants in Ghana I. Longitudinal survey in the Greater Accra Region. *Veterinary Microbiology* 100, 175–188.
16. Bell-Sakyi, L., Paxton, E.A., Munderloh, U.G., Sumption, K.J., 2000, Growth of *Cowdria ruminantium*, the causative agent of heartwater, in a tick cell line. *J. Clin. Microbiol.* 8, 1238-1240.
17. Bezuidenhout, J.D., 1981, The development of a new heartwater vaccine, using *Amblyomma hebraeum* nymphae infected with *Cowdria ruminantium*, In: Proc. International Conference on "Tick biology and control". Grahamstown, South Africa, pp. 41-45.
18. Bezuidenhout, J.D., Jacobsz, G.J., 1986, Proof of transovarial transmission of *Cowdria ruminantium* by *Amblyomma variegatum*. *Onderstepoort J. Vet. Res* 53, 31-34.
19. Bezuidenhout, J.D., Paterson, C.L., Barnard, B.J., 1985, *In vitro* cultivation of *C. Ruminantium*. *Onderstepoort J. Vet. Res* 52, 113-120.
20. Bezuidenhout, J.D., Spickett, A.M., 1985, An *in vivo* comparison of the efficacy of the heartwater blood and ground-up tick suspension vaccines in calves. *Onderstepoort J. vet. Res.* 52, 269-271.
21. Bouyer, J., Stachurski, F., Kaboré, I., Bauer, B., Lancelot, R., 2006, Tsetse control in cattle from pyrethroid footbaths. *Prev. vet. Med.* 78, 223-238.
22. Brayton, K.A., Kappmeyer, L.S., Herndon, D.R., Dark, M.J., Tibbals, D.L., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Knowles Jr, D.P., 2005, Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 102, 844-849.
23. Burrige, M.J., Simmons, L.A., Allan, S.A., 2000, Introduction of potential heartwater vectors and other exotic ticks into Florida on imported reptiles. *J. Parasitol.* 86, 700-704.
24. Camicas, J.-L., Hervy, J.-P., Adam, F., Morel, P.-C., 1998, Les Tiques du monde/The ticks of the world (Nomenclature, stades décrits, hôtes, répartition) ORSTROM Editions, Paris, France, 233 p.
25. Camus, E., 1992, Le Portage asymptomatique de bovins et chèvres Créole guéris de la cowdriose en Guadeloupe. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop* 45, 133-135.
26. Camus, E., Barré, N., 1988, Le Diagnostic de la cowdriose à partir d'un écrasement de cerveau. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop* 41, 247-252.
27. Camus, E., Barré, N., Martinez, D., Uilenberg, G., 1996, Heartwater (cowdriosis), a review. Office International des Epizooties (OIE), Paris, 177 p.
28. CIRDES 1998. Rapport scientifique et technique (CIRDES), p. 46.
29. Collins, N.E., Liebenberg, J., de Villiers, E.P., Brayton, K.A., Louw, E., Pretorius, A., Faber, F.E., van Heerden, H., Josemans, A., van Kleef, M., Steyn, H.C., van Strijp, M.F., Zweygarth, E., Jongejan, F., Maillard, J.-C., Berthier, D., Botha, M., Joubert, F., Corton, C.H., Thomson, N.R., Allsopp, M.T., Allsopp, B.A., 2005, The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 838-843.

30. Collins, N.E., Pretorius, A., Van Kleef, M., Brayton, K.A., Zweggarth, E., Allsopp, B.A., 2003, Development of Improved Vaccines for Heartwater. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 990, 474-484.
31. Cowdry, E.V., 1925, Studies on the aetiology of heartwater. II. *Rickettsia ruminantium* (n.sp.) in the tissues of ticks transmitting the disease. *J. Exp. Med* 42, 253-274.
32. Dame, J.B., Mahan, S.M., Yowell, C.A., 1992, Phylogenetic relationship of *Cowdria ruminantium*, agent of heartwater, to *Anaplasma marginale* and other members of the order *Rickettsiales* determined on the basis of 16S rRNA sequence. *Int. J. syst. Bacteriol.* 42, 270-274.
33. Deem, S.L., Norval, R.A.I., Mahan, S.M., BurrIDGE, M.J., 1996, The epidemiology of heartwater - establishment and maintenance of endemic stability. *Parasitol. Today* 12, 402-405.
34. Du Plessis, J.L., 1970, Pathogenesis of heartwater. I. *Cowdria ruminantium* in the lymph nodes of domestic ruminants. *Onderstepoort J. Vet. Res* 37, 89-96.
35. Du Plessis, J.L., 1981, The influence of dithiosemicarbazone on the immunity of sheep to heartwater. *Onderstepoort J. Vet. Res* 48, 175-176.
36. Du Plessis, J.L., 1985, A method for determining the *Cowdria ruminantium* infection rate of *Amblyomma hebraeum*: effects in mice injected with tick homogenate. *Onderstepoort J. Vet. Res* 52, 55-61.
37. Du Plessis, J.L., Bezuidenhout, J.D., 1979, Investigation on the natural and acquired resistance of cattle to artificial infection with *Cowdria ruminantium*. *Jl S. Afr. vet. med. Assoc.* 50, 334-338.
38. Du Plessis, J.L., Camus, E., Oberem, P.T., Malan, L., 1987, Heartwater serology: some problems with the interpretation of results. *Onderstepoort J. Vet. Res* 54, 327-329.
39. Du Plessis, J.L., Malan, L., 1987, The block method of vaccination against heartwater. *Onderstepoort J. vet. Res.* 54, 493-495.
40. Du Plessis, J.L., Potgieter, F.T., van Gas, L., 1990, An attempt to improve the immunization of sheep against heartwater by using different combinations of 3 stocks of *Cowdria ruminantium*. *Onderstepoort J. Vet. Res* 57, 205-208.
41. Du Plessis, J.L., Van Gas, L., Olivier, J.A., Bezuidenhout, J.D., 1989, The heterogenicity of *Cowdria ruminantium* stocks: cross-immunity and serology in sheep and pathogenicity to mice. *Onderstepoort J. vet. Res* 56, 195-201.
42. Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P.J., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001, Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combination and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145-2165.
43. Euzéby, J.P. 2001. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire (<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ee/ruminantium.html>).
44. Faburay, B., Geysen, D., Ceesay, A., Marcelino, I., Alves, P.M., Taoufik, A., Postigo, M., Bell-Sakyi, L., Jongejan, F., 2007a, Immunisation of sheep against heartwater in The Gambia using inactivated and attenuated *Ehrlichia ruminantium* vaccines. *Vaccine* 25, 7939-7947.

45. Faburay, B., Geysen, D., Munstermann, S., Taoufik, A., Postigo, M., Jongejan, F., 2007b, Molecular detection of *Ehrlichia ruminantium* infection in *Amblyomma variegatum* ticks in The Gambia. *Exp. Appl. Acarol.* 42, 61-74.
46. Faburay, B., Jongejan, F., Taoufik, A., Ceesay, A., Geysen, D., 2007c, Genetic diversity of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks and small ruminants in The Gambia determined by restriction fragment profile analysis. *Veterinary Microbiology*.
47. FAO, 1990, Report of the FAO expert consultation on revision of strategies for the control of ticks and tick-borne diseases, Rome, 25-29 september 1989. *Parassitologia* 32, 3-12.
48. Farougou, S., Kpodekon, M., Tchabode, D.M., Youssao, A.K.I., Boko, C., 2006, Abondance saisonnière des tiques (acari : Ixodidae) parasites des bovins dans la zone soudanienne du Bénin : cas des départements de l'Atacora et de la Donga. *Ann. Méd. Vét.* 150, 145-152.
49. Farougou s., 1998. Contribution à la connaissance de la cowdriose des ruminants. Thèse de 3ème cycle, N°28, Université de DAKAR, 101.
50. Frutos, R., Viari, A., Ferraz, C., Bensaid, A., Morgat, A., Boyer, F., Coissac, E., Vachiéry, N., Demaille, J., Martinez, D., 2006, Comparative Genomics of Three Strains of *Ehrlichia ruminantium*: A Review. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1081, 417-433.
51. Frutos, R., Viari, A., Vachiéry, N., Boyer, F., Martinez, D., 2007, *Ehrlichia ruminantium*: genomic and evolutionary features. *Trends in Parasitology* 23, 414-419.
52. Grindatto, A., Bayala, I., Sidibé, I., Kanwé, A., Mattoni, M., Tomassone, L., 2008. Poster 183: Ticks and tick-borne pathogens in cattle from peri-urban area of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. In: VI International Conference on Ticks and Tick-Borne Pathogens. Buenos Aires, Argentina 21-26 September 2008.
53. Gueye, A., Mbengue, M., Diouf, A., 1990, Ticks and hemoparasitic diseases in cattle in Senegal. IV. The southern Sudan area. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* 42, 517-528.
54. Guèye, A., Vassiliades, G., 1985, Traitement et perspectives de chimioprophylaxie de la cowdriose ovine par une oxytétracycline à longue durée. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop* 38, 428-432.
55. Harbottle, H., White, D.G., McDermott, P.F., Walker, R.D., Zhao, S., 2006, Comparison of Multilocus Sequence Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Antimicrobial Susceptibility Typing for Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolates. *J. Clin. Microbiol* 44, 2449-2457.
56. Hutcheon, D., 1900, History of heartwater. *Agricultural Journal of the Cape of Good Hope* 17, 410-417.
57. Jongejan, F., 1991, Protective immunity to heartwater (*Cowdria ruminantium* infection) is acquired after vaccination with *in vitro* attenuated rickettsiae. *Infect. Immun* 59, 729-731.
58. Jongejan, F., Thielemans, M.J.C., Briere, C., Uilenberg, G., 1991a, Antigenic diversity of *Cowdria ruminantium* isolates determined by cross-immunity. *Rev. vet. Sci.* 51, 24-28.
59. Jongejan, F., Thielemans, M.J.C., de Groot, M., van Kooten, P.J.S., van Der Zeijst, B.A.M., 1991b, Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for heartwater using monoclonal antibodies to a *Cowdria ruminantium*-specific 32-kilodalton protein. *Vet. Microbiol.* 28, 199-211.

60. Jongejan, F., Vogel, S.W., Guèye, A., Uilenberg, G., 1993, Vaccination contre la cowdriose avec des *Cowdria ruminantium* atténuées *in vitro*. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop 46, 223-227.
61. Jongejan, F., Wassink, L.A., Thielemans, M.J.C., Perie, N.M., Uilenberg, G., 1989, Serotypes in *Cowdria ruminantium* and relationship with *Ehrlichia phagocytophila* determined by immunofluorescence. Vet. Microbiol. 21, 31-40.
62. Kaboré, H., Salembéré, M.S., Tamboura, H.H., 1998, Seasonal Variation of Ticks on Cattle in Burkina Faso. Ann. N. Y. Acad. Sci. 849, 398-401.
63. Katz, J.B., DeWald, R., Dawson, J.E., Camus, E., Martinez, D., Mondry, R., 1997, Development and evaluation of a recombinant antigen, monoclonal antibody-based competitive ELISA for heartwater serodiagnosis. J. Vet. Diagn. Invest. 9, 130-135.
64. Kocan, K.M., de la Fuente, J., Guglielmone, A.A., Melendez, R.D., 2003, Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. Clin Microbiol Rev 16, 698-712.
65. Koney, E.B., Walker, A.R., Heron, I.D., Morrow, A.N., Ambrose, N.C., 1994, Seasonal prevalence of ticks and their association with dermatophilosis in cattle on the Accra plains of Ghana. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop. 47, 163-167.
66. Lawrence, J.A., Foggin, C.M., Norval, R.A.I., 1980, The effect of war on the control of the diseases of livestock in Rhodesia (Zimbabwe). Vet. Rec 107, 82-85.
67. Logan, L.L., Whyard, T.L., Quintero, J.C., Mebus, C.A., 1987, The development of *Cowdria ruminantium* in neutrophils. Onderstepoort J. Vet. Res 54, 197-204.
68. Louw, E., Brayton, K.A., Collins, N.E., Pretorius, A., Van Strup, F., Allsopp, B.A., 2002, Sequencing of a 15-kb *Ehrlichia ruminantium* Clone and Evaluation of the cpg1 Open Reading Frame for Protection against Heartwater. Ann. N. Y. Acad. Sci. 969, 147-150.
69. Madder, M., Thys, E., Geysen, D., Baudoux, C., Horak, I., 2007, Boophilus microplus ticks found in West Africa. Exp. Appl. Acarol. 43, 233-234.
70. Mahan, S.M., Kumbula, D., Burrridge, M.J., Barbet, A.F., 1998a, The inactivated *Cowdria ruminantium* vaccine for heartwater protects against heterologous strains and against laboratory and field tick challenge. Vaccine 16, 1203-1211.
71. Mahan, S.M., McGuire, T.C., Semu, S.M., Bowie, M.V., Jongejan, F., Rurangirwa, F.R., Barbet, A.F., 1994, Molecular cloning of a gene encoding the immunogenic 21-kDa protein of *Cowdria ruminantium*. Microbiology 140, 2135-2142.
72. Mahan, S.M., Peter, T.F., Simbi, B.H., Burrridge, M.J., 1998b, PCR detection of *Cowdria ruminantium* infection in ticks and animals from heartwater-endemic regions of Zimbabwe. Trop. Vet. Med. 849, 85-87.
73. Mahan, S.M., Peter, T.F., Simbi, B.H., Kocan, K., Camus, E., Barbet, A.F., Burrridge, M.J., 2000, Comparison of efficacy of American and African *Amblyomma* ticks as vectors of heartwater (*Cowdria ruminantium*) infection by molecular analyses and transmission trials. J. Parasitol. 86, 44-49.
74. Mahan, S.M., Semu, S.M., Peter, T.F., Jongejan, F., 1998c, Evaluation of the MAP 1B ELISA for *Cowdriosis* with field sera from livestock in Zimbabwe. Ann. N.Y. Acad. Sci. 849, 85-87.

75. Mahan, S.M., Waghela, S.D., McGuire, T.C., Rurangirwa, F.R., Wassink, L.A., Barbet, A.F., 1992, A cloned DNA probe for *Cowdria ruminantium* hybridizes with eight heartwater strains and detects infected sheep. J. Clin. Microbiol 30, 981-986.
76. Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B., 1998, Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3140-3145.
77. Marcelino, I., Verissimo, C., Sousa, M.F.Q., Carrondo, M.J.T., Alves, P.M., 2005, Characterization of *Ehrlichia ruminantium* replication and release kinetics in endothelial cell cultures. Veterinary Microbiology 110, 87-96.
78. Marcelino, I.E., 2007. Development of a Vaccine Candidate against Heartwater: Producing obligate intracellular bacteria for veterinary application. PhD thesis, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal. 208pp.
79. Martinez, D., Coisne, S., Sheikboudou, C., Jongejan, F., 1993a, Detection of antibodies to *Cowdria ruminantium* in the serum of domestic ruminants by ELISA. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop 46, 115-120.
80. Martinez, D., Maillard, J.C., Coisne, S., Sheikboudou, C., Bensaid, A., 1993b, Protection of goats against heartwater acquired by immunization with inactivated elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop 46, 229.
81. Martinez, D., Maillard, J.C., Coisne, S., Sheikboudou, C., Bensaid, A., 1994, Protection of goats against heartwater acquired by immunisation with inactivated elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. Vet. Immunol. Immunopathol. 41, 153-163.
82. Martinez, D., Perez, J.M., Sheikboudou, C., Debus, A., Bensaid, A., 1996, Comparative efficacy of Freund's and Montanide ISA50 adjuvants for the immunisation of goats against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. Vet. Parasitol. 67, 175-184.
83. Martinez, D., Swinkels, J., Camus, E., Jongejan, F., 1990, Comparaison de trois antigènes pour le sérodiagnostic de la cowdriose par immunofluorescence indirecte. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop 43, 159-166.
84. Martinez, D., Vachiery, N., Stachurski, F., Kandassamy, Y., Raliniaina, M., Aprelon, R., Guèye, A., 2004, Nested-PCR for detection and genotyping of *Ehrlichia ruminantium* ; use in genetic diversity analysis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1026, 106-113.
85. Mattioli, R.C., Janneh, L., Corr, N., Faye, J.A., Pandey, V.S., Verhulst, A., 1997, Seasonal prevalence of ticks and tick-transmitted haemoparasites in traditionally managed N'Dama cattle with reference to strategic tick control in the Gambia. Med. Vet. Entomol. 11, 342-348.
86. McCombie, R.L., Finkelstein, R.A., Woods, D.E., 2006, Multilocus Sequence Typing of Historical *Burkholderia pseudomallei* Isolates Collected in Southeast Asia from 1964 to 1967 Provides Insight into the epidemiology of Melioidosis. J. Clin. Microbiol. 44, 2951-2962.
87. Molia, S., Frebling, M., Vachiéry, N., Pinarello, V., Petitclerc, M., Rousteau, A., Martinez, D., Lefrançois, T., 2008, *Amblyomma variegatum* in cattle in Marie Galante, French Antilles: Prevalence, control measures, and infection by *Ehrlichia ruminantium*. Vet. Parasitol. 153, 338-346.
88. Moshkovski, S.D., 1947, Comments by readers. Science 106, 62.

89. MRA, 2003, Rapport National sur l'état des ressources génétiques animales au Burkina Faso, Ministère des Ressources Animales, Burkina Faso, 73 pp.
90. Neitz, W.O., 1968, Heartwater. Bull. Off. Int. Epiz 70, 329-336.
91. Niyaz, A., Devi, S.M., Valverde, M.d.l.Á., Vijayachari, P., Machang'u, R.S., Ellis, W.A., Hartskeerl, R.A., 2006, Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 5, 28.
92. Norval, R.A.I., Barrett, J.C., Perry, B.D., Mukhebi, A.W., 1992a, Economics, epidemiology and ecology: a multidisciplinary approach to the planning and appraisal of tick and tick-borne disease control in southern Africa, In: Fivaz, B., Petney, T., Horak, I. (Eds.) Tick vector biology. Medical and veterinary aspects. Springer-Verlag, Berlin, pp. 35-54.
93. Norval, R.A.I., Perry, B.D., Young, A.S., 1992b, The Epidemiology of Theileriosis in Africa. Academic Press.
94. Nyika, A., Barbet, A.F., Burrridge, M.J., Mahan, S.M., 2002, DNA vaccination with the map1 gene followed by protein boost augments protection against challenge with *Cowdria ruminantium*, the agent of heartwater. Vaccine 20, 1215-1225.
95. Nyika, A., Mahan, S.M., Burrridge, M.J., McGuire, T.C., Rurangirwa, F., Barbet, A.F., 1998, A DNA vaccine protects mice against the rickettsial agent *Cowdria ruminantium*. Parasite Immunol. 20, 111-119.
96. Oberem, P.T., Bezuidenhout, J.D., 1987, The production of heartwater vaccine. Onderstepoort J. Vet. Res 54, 485-488.
97. Ouedraogo, A., 1975. Les tiques des animaux domestiques de Haute-Volta. Thèse Méd. Vét. Dakar-EISMV, n°4, 128pp, 128.
98. Pangui, L.J., Salifou, S., 1992, Enquêtes parasitologiques sur les hémoparasites des bovins transmis par les tiques au Bénin. Rev. Mond. Zootech. 73, 48-50.
99. Perez, J.-M., Martinez, D., Debus, A., Sheikboudou, C., Bensaid, A., 1997, Detection of genomic polymorphisms among isolates of the bacterium *Cowdria ruminantium* by random amplified polymorphic DNA and Southern blotting. FEMS Microbiolgy Letters 154, 73-79.
100. Peter, T.F., Barbet, A.F., Alleman, A.R., Simbi, B.H., Burrridge, M.J., Mahan, S.M., 2000, Detection of the agent of heartwater, *Cowdria ruminantium*, in *Amblyomma* ticks by PCR: validation and application of the assay to field ticks. J. Clin. Microbiol. 38, 1539-1544.
101. Peter, T.F., Burrridge, M.J., Mahan, S.M., 2002a, *Ehrlichia ruminantium* infection (heartwater) in wild animals. Trends in Parasitology 18, 214-218.
102. Peter, T.F., O'Callaghan, C.J., Medley, G.F., Perry, B.D., Semu, S.M., Mahan, S.M., 2002b, Population-based evaluation of the *Ehrlichia ruminantium* MAP 1B indirect ELISA. Exp. Appl. Acarol 25, 881-897.
103. Postigo, M., Taoufik, A., Bell-Sakyi, L., de Vries, E., Morrison, W.I., Jongejan, F., 2007, Differential transcription of the major antigenic protein 1 multigene family of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks. Vet. Microbiol. 122, 298-305.

104. Pretorius, A., Collins, N.E., Steyn, H.C., van Strijp, F., van Kleef, M., Allsopp, B.A., 2007, Protection against heartwater by DNA immunisation with four *Ehrlichia ruminantium* open reading frames. *Vaccine* 25, 2316–2324.
105. Pretorius, A., van Kleef, M., Collins, N.E., Tshikudo, N., Louw, E., Faber, F.E., van Strijpa, M.F., Allsopp, B.A., 2008, A heterologous prime/boost immunisation strategy protects against virulent *E. ruminantium* Welgevonden needle challenge but not against tick challenge. *Vaccine* 26, 4363–4371.
106. Purchase, H.S., 1945, A simple and rapid method for demonstrating *Rickettsia ruminantium* (Cowdry, 1926) in heartwater brains. *Vet. Rec* 57, 413–414.
107. Raliniaina, M., Meyer, D.F., Pinarello, V., Sheikboudou, C., Emboulé, L., Kandassamy, Y., Adakal, H., Stachurski, F., Martinez, D., Lefrançois, T., Vachiéry, N., 2009, Mining the genetic diversity of *Ehrlichia ruminantium* using map genes family. *Veterinary Parasitology*, doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.020.
108. Reinert, R.R., Muckel, S., Al-Lahham, A., Spratt, B.G., Brueggemann, A.B., Hakenbeck, R., Lütticken, R., 2003, Characterization of German penicillin non-susceptible serotype 23F pneumococci using multilocus sequence typing. *Journal of Medical Microbiology* 52, 981–987.
109. Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J., Gilmour, M.N., Whittam, T.S., 1986, Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 51, 873–884.
110. Selander, R.K., Caugant, D.A., Whittam, T.S., 1987, Genetic structure and variation in natural populations of *E. coli*, In: Neihardt, F.C. (Ed.) *E. coli* and *S. typhimurium*. Cellular and molecular biology. Washington: ASM pp. 1625–1648.
111. Semu, S.M., Peter, T.F., Mukwedeya, D., Barbet, A.F., Jongejan, F., Mahan, S.M., 2001, Antibody responses to MAP 1B and other *Cowdria ruminantium* antigens are down regulated in cattle challenged with tick-transmitted heartwater. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 388–396.
112. Simbi, B.H., Bowie, M.V., McGuire, T.C., Barbet, A.F., Mahan, S.M., 2006, Evaluation of *E. ruminantium* Genes in DBA/2 Mice as Potential DNA Vaccine Candidates for Control of Heartwater. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1078, 424–437.
113. Smith, G.E., Anderson, E.C., Burr ridge, M.J., Peter, T.F., Mahan, S.M., 1998, Growth of *Cowdria ruminantium* in tissue culture endothelial cell lines from wild African mammals. *J Wildl Dis* 34, 297–304.
114. Soldan, A.W., Norman, T.L., Masaka, S., Paxton, E.A., Edelsten, R.M., Sumption, K.J., 1993, Séroconversion à *Cowdria ruminantium* de veaux zébus au Malawi, soumis à des stratégies de lutte contre les tiques. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop* 46, 171–177.
115. Stachurski, F., 2000a, Invasion of West African Cattle by the tick *Amblyomma variegatum*. *Med. Vet. Entomol.* 14, 391–399.
116. Stachurski, F., 2000b. Modalités de la rencontre entre la stase adulte de la tique *Amblyomma variegatum* (Acari, Ixodida) et les bovins : applications potentielles à la lutte contre ce parasite. Thèse de Doctorat ès Sciences. Université de Montpellier II (Sciences et Techniques du Languedoc), 264.

117. Stachurski, F., 2006, Attachment kinetics of the adult tick *Amblyomma variegatum* to cattle. Med. Vet. Entomol. 20, 317-324.
118. Stachurski, F., Lancelot, R., 2006, Foot-bath acaricide treatment to control cattle infestation by the tick *Amblyomma variegatum*. Med. Vet. Entomol. 20, 402-412.
119. Sumption, K.J., Paxton, E.A., Bell-Sakyi, L., 2003, Development of a polyclonal competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Ehrlichia ruminantium* Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10, 910-916.
120. Tomassone, L., Camicas, J.-L., Pagani, P., Diallo, O.T., Mannelli, A., De Meneghi, D., 2004, Monthly dynamics of ticks (Acari: Ixodida) infesting N'Dama cattle in the Republic of Guinea. Exp. Appl. Acarol. 32, 209-218.
121. Totte, P., Blankaert, D., Marique, T., Kirkpatrick, C., van Vooren, J.P., Werenne, J., 1993, Culture de cellules bovines et humaines sur des microsphères de collagène et leur infection avec la rickettsie *Cowdria ruminantium*: perspectives pour la production des cellules et de vaccin. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop 46, 153-156.
122. Totte, P., McKeever, D., Martinez, D., Bensaid, A., 1997, Analysis of T-cell responses in cattle immunised against heartwater by vaccination with killed elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. Infect. Immun 65, 236-241.
123. Totté, P., Nyanjui, J., Bensaid, A., McKeever, D., 1998, The use of CD4+ T-cell lines to screen for immunogenic proteins of *Cowdria ruminantium*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 849, 375-377.
124. Totté, P., Nyanjuib, J., Bensaid, A., McKeever, D., 1999, Bovine CD4+ T-cell lines reactive with soluble and membrane antigens of *Cowdria ruminantium*. Vet. Immunol. Immunopathol. 70 269-276.
125. Uilenberg, G., 1982a, Experimental transmission of *Cowdria ruminantium* by the Gulf Coast tick *Amblyomma maculatum*: Danger of introducing heartwater and benign African theileriasis onto the American mainland. American Journal of Veterinary Research 43, 1279-1282.
126. Uilenberg, G., 1983, Heartwater (*Cowdria ruminantium* infection): current status. Advances in veterinary Science and Comparative Medecine 27, 427-480.
127. Uilenberg, G., 1990, Present and future possibilities for the control of cowdriosis and anaplasmosis. Vet Q 12, 39-45.
128. Uilenberg, G., Camus, E., Barré, N., 1985, Quelques observations sur une souche de *Cowdria ruminantium* isolée en Guadeloupe (Antilles françaises). Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop 38, 34-42.
129. Uilenberg, G., Zivkovic, D., Dwinger, R.H., Terhuurne, A.A.H.M., Perie, N.M., 1983, Cross-immunity between strains of *Cowdria ruminantium*. Res. vet. Sci. 35, 200-205.
130. Vachiéry, N., Lefrançois, T., Esteves, I., Molia, S., Sheikboudou, C., Kandassamy, Y., Martinez, D., 2006, Optimisation of the inactivated vaccine dose against heartwater and in vitro quantification of *Ehrlichia ruminantium* challenge material. Vaccine 24, 4747-4756.
131. Vachiéry, N., Maganga, G., Lefrançois, T., Kandassamy, Y., Stachurski, F., Adakal, H., Ferraz, C., Morgat, A., Bensaid, A., Coissac, E., Boyer, F., Demaille, J., Viari, A., Martinez, D., Frutos, R., 2008, Differential strain-specific diagnosis of the heartwater agent: *Ehrlichia ruminantium*. Infection, Genetics and Evolution 8, 459-466.

132. van Amstel, S.R., Oberem, P.T., 1987, The treatment of heartwater. *Onderstepoort J. Vet. Res* 54, 287-290.
133. van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M., 2007, Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 13, 1–46.
134. Van Der, M., 1987, The infection and treatment method of vaccination against heartwater. *Onderstepoort J. vet. Res.* 54, 489-491.
135. van Heerden, H., Collins, N.E., Brayton, K.A., Rademeyer, C., Allsopp, B.A., 2004a, Characterization of a major outer membrane protein multigene family in *Ehrlichia ruminantium*. *Gene* 330, 159-168.
136. Van Heerden, H., Steyn, H.C., Allsopp, M.T.E.P., Zweggarth, E., Josemans, A.I., Allsopp, B.A., 2004b, Characterization of the pCS20 region of different *Ehrlichia ruminantium* isolates. *Vet. Microbiol.* 101, 279-291.
137. Van Kleef, M., Gunter, N.J., Macmillan, H., Allsopp, B.A., Shkap, V., Brown, W.C., 2000, Identification of *Cowdria ruminantium* antigens that stimulate proliferation of lymphocytes from cattle immunized by infection and treatment or with inactivated organisms. *Infect Immun* 68, 603-614.
138. van Vliet, A.H.M., Jongejan, F., van Der Zeijst, B.A.M., 1992, Phylogenetic position of *Cowdria ruminantium* (Rickettsiales) determined by analysis of amplified 16S ribosomal DNA sequences. *Int. J. syst. Bacteriol.* 42, 494-498.
139. van Vliet, A.H.M., Jongejan, F., van Kleef, M., van Der Zeijst, B.A.M., 1994, Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding the immunodominant 32-kilodalton protein of *Cowdria ruminantium*. *Infect. Immun* 62, 1451-1456.
140. van Vliet, A.H.M., Zeijst, v.D., Camus, E., Mahan, S.M., Martinez, D., Jongejan, F., 1995, Use of a specific immunogenic region of *C. ruminantium* MAP 1 protein in a serological assay. *J. Clin. Microbiol* 33, 2405-2410.
141. van Winkelhoff, A.J., Uilenberg, G., 1981, Cross-immunity studies with strains of *Cowdria ruminantium* isolated in West and South Africa. *Trop. anim. Hlth Prod* 13, 160-164.
142. Viljoen, G.J., Vermeulen, N.M.J., Neitz, A.W.H., 1987, Theoretical aspects of the enzyme-linked immunosorbent assay technique and its use in the detection of *Cowdria ruminantium* antigen and antibody in reacting animals. *Onderstepoort J. Vet. Res* 54, 305-312.
143. Viljoen, G.J., VERMEULEN, N.M.J., Oberem, P.T., Prozesky, L., Verschoor, J.A., Bezuidenhout, J.D., Putterill, J.F., Visser, L., Neitz, A.W.H., 1985, Isolation of *Cowdria ruminantium* by cellular affinity chromatography and detection by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Onderstepoort J. Vet. Res* 52, 227-232.
144. Waghela, S.D., Rurangirwa, F.R., Mahan, S.M., Yunker, C.E., Crawford, T.B., Barbet, A.F., Burridge, M.J., McGuire, T.C., 1991, A cloned DNA probe identifies *Cowdria ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks. *J. Clin. Microbiol* 29, 2571-2577.

145. Walker, A.R., Bouattour, A., Camicas, J.-L., Estrada-Peña, A., Horak, I., Latif, A.A., Pegram, R.G., Preston, P.M., 2003, Ticks of Domestic Animals in Africa: A guide of Identification of Species. Bioscience Reports, Atalanta, Houten, The Netherlands, 219 p.
146. Walker, J.B., Olwage, A., 1987, The tick vectors of *Cowdria ruminantium* (Ixodoidea, Ixodidae, genus *Amblyomma*) and their distribution. Onderstepoort J. vet. Res. 54, 353-379.
147. Zweygarth, E., Josemans, A.I., 2001, Continuous *in vitro* propagation of *Cowdria ruminantium* (Welgevonden stock) in a canine macrophage-monocyte cell line. Onderstepoort J. vet. Res. 68, 155-157.
148. Zweygarth, E., Josemans, A.I., Van Strijp, F.M., Lopez-Rebollar, L., Van Kleef, M., Allsopp, B.A., 2005, An attenuated *Ehrlichia ruminantium* (Welgevonden stock) vaccine protects small ruminants against virulent heartwater challenge. Vaccine 23, 1695-1702.

Annexes

ANNEXE 1 : PROJET AUF

DESCRIPTIF DETAILLE DU SUJET

Titre: Vers un vaccin local contre la cowdriose en Afrique de l'Ouest ?

Résumé :

La cowdriose est une maladie due à une rickettsie, *Ehrlichia ruminantium*. Elle est transmise aux animaux domestiques et sauvages par les tiques du genre *Amblyomma*. La maladie est présente en Afrique au sud du Sahara, à Madagascar et dans d'autres îles de l'océan Indien, et dans certaines îles des Caraïbes. Elle peut entraîner des mortalités importantes, en particulier chez les petits ruminants et les bovins exotiques, et constitue de ce fait une entrave aux programmes d'amélioration génétique des races locales. La mortalité chez les animaux sensibles peut en effet atteindre 80% (Uilenberg, 1983). Il existe un seul vaccin commercial vivant qui est utilisé principalement en Afrique du Sud mais il possède un grand nombre d'inconvénients notamment la possible transmission d'autres pathogènes et l'obligation du respect de la chaîne du froid. Dans le cadre de la recherche, différents types de vaccins (vaccin inactivé, vaccin atténué, vaccin ADN) ont été testés. Les résultats sont probants en conditions contrôlées, mais leur efficacité sur le terrain s'est avérée très limitée notamment vis-à-vis des souches hétérologues. Le réel frein à tous ces vaccins est incontestablement la grande diversité génétique et antigénique d'*E. ruminantium*. Il est donc apparu que la mise au point d'un vaccin efficace passe par un choix judicieux des souches vaccinales dont l'identification se fera en étudiant leur variabilité au niveau génétique et antigénique. Dans le contexte d'une forte diversité génétique et antigénique d'*Ehrlichia ruminantium*, une récente étude a été conduite par le CIRDES en collaboration avec l'UMR15 CIRAD/INRA sur une population d'*E. ruminantium* identifiées dans des tiques récoltées sur le terrain durant deux années consécutives au Burkina Faso. L'étude a montré, grâce à une analyse de séquences de type MLST (Multilocus Sequence Typing), qu'il émerge à partir de la population de base, en stase, une autre population clonale, qui elle, est en expansion. Ce mécanisme local pourrait expliquer l'inefficacité de vaccins "génériques" sur le terrain et l'inadéquation des stratégies vaccinales actuelles.

Le présent projet a pour objectif d'une part, d'étendre l'étude de la structuration des populations d'*E. ruminantium* au Bénin et au Mali en appliquant le même type d'analyse MLST à des souches qui seront récoltées sur le terrain, afin de vérifier si la situation observée

au Burkina Faso est identique ou différente à un niveau sous-régional. Grâce à l'approche MLST, une étude de phylogénie et phylogéographie des souches d'*Ehrlichia ruminnatum* sur une zone plus étendue incluant le Bénin et le Mali sera réalisée. À la suite de la caractérisation génétique et sur la base des données génétiques obtenues, nous explorerons les caractéristiques fonctionnelles des souches du CIRDES à travers des essais de protection croisée en vue d'un choix de souches candidates à l'élaboration de vaccin local.

Problématique

La cowdriose est une maladie transmise par les tiques du genre *Amblyomma*. En Afrique de l'Ouest, et précisément au Bénin et au Burkina Faso, c'est *Amblyomma variegatum* qui en est le vecteur. Elle représente une contrainte majeure au développement des productions animales par la mortalité importante qu'elle engendre surtout chez les races bovines exotiques, importées pour améliorer les performances des races locales (Uilenberg, 1983; Mukhebi et al., 1999).

En 1998, une étude conduite par Farougou et al. au centre et au nord du Bénin a permis de confirmer l'existence de la cowdriose au Bénin (Farougou et al., 1998; Farougou s., 1998). De 2005 à 2007, la cartographie de la tique vectrice réalisée sur tout le territoire de la République du Bénin a montré qu'*Amblyomma variegatum* est distribuée du nord au sud sur toutes les zones écologiques (Farougou et al., 2006; Farougou et al., 2007a; Farougou et al., 2007b).

Au Burkina Faso, la cowdriose a été identifiée pour la première fois en 1984, sur des bovins de race laitière importés d'Europe. D'autre part, les tentatives de transfert de moutons sahéliens (de race Bali-Bali) du nord du pays (Dori, Gorom-Gorom,...) où la tique vectrice *A. variegatum* n'est pas présente, vers la zone subhumide (Bobo-Dioulasso et environs), où la cowdriose est enzootique, en vue d'augmenter le format des ovins Djallonké par croisement, se traduisent régulièrement par une forte mortalité des moutons introduits. Ainsi, en octobre 1995, 40 des 240 ovins sahéliens (17%) introduits par le CIRDES à des fins expérimentales, sont-ils morts de cowdriose avant qu'il ne soit possible de limiter les pertes par des mesures de traitement systématique des animaux à l'Oxytétracycline. En 2002 et 2003, des essais vaccinaux conduits en zone subhumide par le CIRDES sur des moutons sahéliens s'étaient soldés par des mortalités de 49 % et 54 % dans les groupes témoins, respectivement sur les deux années consécutives. La cowdriose a été diagnostiquée comme cause de la mort chez tous les animaux examinés (CIRDES et al., 2005).

Enfin, dans de nombreuses régions, de fortes mortalités imputables à la cowdriose, pouvant aller jusqu'à 30 ou 40% chez des agneaux pourtant nés et élevés en zone d'enzootie, ont été

signalées par les éleveurs ou les vétérinaires. Ces mortalités sont essentiellement observées en début de saison sèche, au moment du pic d'infestation des animaux par les nymphes d'*A. variegatum* et témoignent d'une absence de stabilité enzootique vis-à-vis de la cowdriose chez les petits ruminants.

Il n'est alors pas surprenant que toute tentative d'augmentation de la production, soit bovine (en viande et surtout en lait) par croisement des bovins locaux avec des animaux exotiques, soit ovine par croisement des moutons sahéliens bali-bali – très recherchés lors des fêtes de Tabaski – et des Djallonkés pour améliorer le gabarit de ces derniers, se traduise par des fortes pertes chez les animaux introduits dans des zones d'enzootie, s'ils ne sont pas protégés de façon efficace contre la cowdriose. Il existe un seul vaccin commercial vivant qui est utilisé principalement en Afrique du Sud mais il possède un grand nombre d'inconvénients notamment la possible transmission d'autres pathogènes et l'obligation du respect de la chaîne du froid. Face à ces inconvénients, le besoin d'un meilleur vaccin qui permettrait de protéger ces animaux avant leur introduction dans la zone enzootique aiderait grandement dans la lutte contre la maladie.

Les résultats de nombreuses tentatives de mise au point de vaccins contre la cowdriose depuis des décennies sont restés mitigés. Ceux-ci incluent des essais de vaccins inactivés (Martinez et al., 1994; Totte et al., 1997; Mahan et al., 1998), de vaccins atténués (Jongejan, 1991; Zweygarth et al., 2005; Zweygarth et al., 2008) et de vaccins à ADN recombinant (Nyika et al., 1998; Nyika et al., 2002; Collins et al., 2003; Simbi et al., 2006). Concernant le vaccin inactivé, des travaux ont montré une diminution de la dose minimale vaccinale efficace et la possibilité de la production du vaccin en conditions industrielles. Ces résultats impliquent une diminution drastique du coût d'une dose (0.11 euros/dose) permettant ainsi sa possible utilisation pour les pays du Sud (Vachiéry et al., 2006; Marcelino et al., 2007).

Quelque soit le type de vaccin utilisé, lors d'essais en conditions contrôlées et en épreuves homologues, les résultats étaient très probants avec une efficacité du vaccin allant jusqu'à 80% suivant le type de vaccin. Par contre, les résultats des épreuves vis-à-vis de souches hétérologues ne sont généralement pas satisfaisants, la vaccination ne conférant que des protections variées et partielles. Récemment, Pretorius et al. (Pretorius et al., 2007; Pretorius et al., 2008) ont testé un vaccin à ADN recombinant constitué de quatre fragments codants de la souche Welgevonden d'Afrique du Sud. La protection conférée par ce cocktail n'a pas dépassé 20% lorsque les animaux immunisés ont été soumis à l'infestation naturelle par les tiques *Amblyomma*, donc à des infections hétérologues naturelles. Ce qui confirme bien

qu'une souche unique ne pourra très probablement pas assurer une protection satisfaisante sur le terrain.

En 2003 et 2004, dans le cadre d'un projet conjoint d'étude sur la cowdriose coordonnée par le CIRAD, le CIRDES a entrepris des essais de vaccination à l'aide d'un vaccin inactivé expérimental dans les villages de Békuy, Sara, Lamba et Banankélédaga, au Burkina Faso. Le vaccin testé en 2003 contenait la souche Gardel isolée en Guadeloupe, tandis qu'en 2004, on lui adjoignit une souche locale, BK242, isolée quelques années plus tôt à Békuy. Dans le but d'étudier la diversité génétique des souches de terrain d'*E. ruminantium* détectées dans les prélèvements (cortex) faits lors de ces études, un génotypage a été réalisé par PCR-RFLP sur les séquences du gène *map1*. Les résultats ont montré que la majorité des groupes génotypiques *map1* de référence sont retrouvés dans la zone d'essais, grande d'une dizaine de kilomètres carrés (CIRDES et al., 2005). Cependant, le génotypage effectué sur *map1* même s'il représente un bon marqueur de typage par sa capacité de discrimination de souches ne corrèle ni avec l'origine géographique ni avec la protection croisée. Par exemple, on a constaté que la souche vaccinale BK242 ne protégeait pas contre toutes les souches de terrain appartenant au même groupe génotypique *map1*, le groupe Pokoase/Senegal (P/S). En effet, des souches du même groupe, dont certaines ont pu être isolées sur culture cellulaire, ont été identifiées sur les cortex d'animaux vaccinés. Pour comprendre le degré de protection croisée intra-groupe, des essais ont alors été conduits en étable et la souche BK433S du groupe P/S isolée sur un animal vacciné a été utilisée pour immuniser les animaux d'essai. Après une épreuve homologe, aucune hyperthermie ne fut enregistrée fournissant ainsi la preuve d'une bonne immunisation. Pour le challenge hétérologue, deux souches ont été choisies : BK242 et SR445 toutes deux appartenant au groupe P/S. A l'issue de l'épreuve hétérologue, aucune réaction ne fut enregistrée chez les animaux immunisés des 2 groupes. Par contre, tous les animaux témoins succombèrent à l'inoculation des BK242 et SR445. Ces résultats montrèrent que la protection croisée entre BK433S et les deux souches du groupe P/S (BK242 et SR445) était complète, allant à l'encontre des observations de terrain. Cependant, la situation inverse, celle observée sur le terrain (autrement dit la présence de BK433S chez des animaux vaccinés par BK242), n'a pas été étudiée lors d'une immunisation en étable par BK 242.

L'ensemble de ces essais a montré d'une part 1) que même si la protection conférée par le cocktail vaccinal Gardel-BK242 reste limitée, insuffisante et variable en fonction des villages, l'ajout de la souche locale a significativement diminué la mortalité chez les animaux vaccinés (CIRDES et al., 2005) ; 2) qu'il est donc possible d'améliorer le niveau de protection conférée par un vaccin par un choix judicieux des souches candidates au vaccin, ce qui implique la

nécessité d'une meilleure connaissance de la structuration et de l'évolution des populations d'*E. ruminantium* sur le terrain ; et 3) que la méthode de caractérisation par PCR-RFLP sur le *map1* ne permet pas de sélectionner des souches vaccinales en connaissant leur phénotype. Dès lors que les génomes de deux souches d'*E. ruminantium* (Gardel et Welgevonden) ont été disponibles (Collins et al., 2005; Frutos et al., 2006), il était possible d'adopter une nouvelle approche de typage basée sur l'analyse de plusieurs gènes neutres permettant à la fois une analyse phylogénique et phylogéographique. De plus, par cette approche, l'identification de marqueurs génétiques de groupe de protection en corrélant et le phénotype (niveau de protection croisée) et le génotype (signature génétique) des souches est possible. C'est dans cette optique que les travaux de thèse de Hassane Adakal, axés sur l'application de la MLST (Multi Locus Sequence Typing) sur des populations d'*E. ruminantium* du Burkina Faso, sont actuellement conduits en collaboration avec l'UMR15 CIRAD/INRA. Les résultats préliminaires en cours de publication montrent que les souches récoltées sur le terrain durant deux années consécutives se distinguent en deux groupes du point de vue de l'analyse MLST faite sur 8 gènes de ménage. Il émerge clairement à partir de la population de base, en stase, une autre population clonale, qui elle, est en expansion avec plus de souches appartenant à ce groupe. Ce mécanisme local pourrait expliquer l'inefficacité sur le terrain de vaccins "génériques" produits à partir de souches de laboratoire d'origine différente et l'inadéquation des stratégies vaccinales actuelles à être efficace à l'échelle globale. D'où l'intérêt de caractériser les populations de souches au niveau local en utilisant des outils de détection et de traçage adaptés, un travail débuté au Burkina Faso à travers la thèse de H. Adakal et de faire des actions vaccinales au niveau local sur le terrain.

Objectifs :

Objectif du projet :

La mise en place d'une vaccination efficace contre la cowdriose facilitera l'établissement d'un état de stabilité enzootique, ce qui réduira considérablement les pertes dues à la cowdriose chez les jeunes animaux en zone endémique et rendra possible le transfert d'animaux plus productifs de zone indemne en zone endémique. En somme, la vaccination contre la cowdriose contribuera à augmenter le rendement des productions animales en Afrique de l'Ouest.

Objectifs spécifiques de l'action traitée :

1. Etendre l'analyse par MLST de la structuration des populations d'*E. ruminantium* (développée dans le cadre de la thèse de Adakal) aux échantillons de terrain qui seront récoltés au Mali et au Bénin ;
2. Explorer, sur la base des données génétiques obtenues, les capacités de protection de huit (8) souches du Burkina Faso isolées en culture pour lesquelles des données MLST ont déjà été générées par l'UMR15 en collaboration avec le CIRDES en vue de choisir celles ayant un potentiel vaccinal avéré pour l'élaboration d'un vaccin local.

Ce travail se présente comme un prolongement des activités menées par Hassane Adakal dans le cadre de sa thèse d'Université conduite en alternance entre le CIRDES et le CIRAD et qui a reçu l'appui financier de l'AUF à travers l'octroi d'une bourse de mobilité (2007-2009).

Hypothèses de travail

1. Il existe une très grande variabilité antigénique (van Winkelhoff et al., 1981; Uilenberg, 1983; Adakal et al., 2004) et génétique des souches d'*E. ruminantium* (Reddy et al., 1996; Allsopp et al., 2001; Frutos et al., 2007; Raliniaina et al., 2008), en relation avec un polymorphisme de séquence que l'on peut mettre en évidence par génotypage ;
2. L'utilisation de méthodes d'analyse ciblant des loci multiples sur le génome de type MLST peut apporter une meilleure connaissance de la structuration des populations d'*E. ruminantium*, et déboucher sur l'établissement de groupes génotypiques corrélés à des groupes de protection croisée ;
3. La combinaison de deux ou plusieurs souches « intelligemment choisies » peut considérablement améliorer le niveau de protection vaccinale sur le terrain (CIRDES et al., 2005).

Méthodologie

L'idée de ce projet est de vérifier si la structuration des populations d'*E. ruminantium* telle qu'observée à l'échelle locale du Burkina Faso est identique ou différente à une échelle sous-régionale. Les résultats de l'analyse MLST sur des souches isolées au Bénin et au Mali et sur huit (8) souches du Burkina Faso isolées en culture seront confrontés aux données de

protection croisée afin d'effectuer un « choix intelligent » de souches candidates à la formulation de cocktails vaccinaux. Ainsi, les différentes étapes de l'étude consisteront à :

- a) Récolter des tiques *A. variegatum* au Mali et Bénin selon l'échantillonnage suivi au Burkina Faso ;
- b) Utiliser les nymphes récoltées au Mali et Bénin, après leur mue en adultes, pour isoler de nouvelles souches d'*E. ruminantium* et les cultiver sur cellules endothéliales bovines localement;
- c) typer par MLST aussi bien les souches du Mali et du Bénin contenues dans les tiques ainsi que les souches isolées en culture;
- d) Evaluer le degré de protection des quelques unes des 8 souches du CIRDES par des essais de protection croisée en étable et proposer deux ou trois souches pour l'élaboration d'un vaccin local mixte.

a. Récolte de tiques

Le plan d'échantillonnage suivi au Burkina Faso était calqué sur les périodes d'activités des adultes et des nymphes d'*A. variegatum* qui sont les deux principaux stades de la tique impliqués dans la transmission de la maladie. Le suivi était conduit, deux années durant, dans 3 villages et sur des bovins, ovins et caprins. Etant donné que les résultats obtenus n'ont pas montré un effet « village » ou « espèce animale », les suivis de collecte de tiques au Mali et au Bénin se limiteront dans un seul village et sur bovins. Au Bénin, ce sont les villages de Pahou et Calavi (sud du Bénin) qui sont retenus parce que l'élevage des ruminants y est développé et des études y ont été réalisées sur l'abondance saisonnière d'*Amblyomma variegatum*. De plus, le suivi des différentes opérations sera facilité par l'existence du personnel technique sur place ou dans les environs immédiats. Au Mali, les suivis auront lieu dans la région de Sikasso où le CIRDES mène déjà des activités.

Le suivi longitudinal se fera durant une année. Les sessions de collecte de tiques auront lieu une fois par mois pendant les périodes d'activité des adultes, i.e. en saison des pluies, et des nymphes i.e. en saison sèche. A chaque session, environ 30 bovins seront examinés parmi les plus infestés des troupeaux visités. Les animaux seront entièrement détiqués, les adultes d'*A. variegatum* seront mis en alcool tandis que les nymphes gorgées seront conservées vivantes jusqu'à la mue en adulte. Cinq tiques par session et par animal seront examinées pour la recherche d'*E. ruminantium* par nested-PCR pCS20. Seuls les échantillons positifs seront utilisés pour l'amplification des gènes MLST.

b. Isolement des souches sur culture cellulaire

L'isolement de nouvelles souches du Mali et du Bénin se fera par infestation de moutons sahéliens par les nymphes muées en adultes. Cinq lots de 15 mâles et 15 femelles (nombre fixé sur la base du taux d'infection de 4% obtenu sur les tiques du Burkina Faso), choisies au hasard, seront constitués pour l'infestation des animaux qui seront quotidiennement suivis jusqu'à l'apparition de l'hyperthermie. Le sang de chaque animal qui réagit sera prélevé et utilisé pour l'isolement d'une souche. Parallèlement, sept (7) souches déjà isolées et conservées au CIRDES seront également remises en culture. Il s'agit de Bekuy 242, Sara 445, Sara 292, Bankouma 421 Lamba 479, Bekuy 255 et Banan 112. Les sept souches ont été testées en épreuve hétérologue après immunisation par des souches de référence Gardel et Welgevonden (données de la thèse de Adakal en cours de préparation). De plus, les données de typage MLST sont disponibles ces souches. La souche Bekuy 433S, non encore isolée sur culture cellulaire, sera également utilisée en raison des données de protection croisée disponibles vis-à-vis de Bk242 et SR445, le typage de cette souche permettra de confirmer son choix. Chacune de ces souches sera inoculée à un mouton naïf i.e. indemne de cowdriose. Le sang infecté sera collecté au moment de l'hyperthermie pour l'isolement en culture cellulaire. Les animaux seront suivis et traités pour éviter la mort une fois le sang prélevé. Ces animaux, qui seront immunisés après traitement, pourront du reste être utilisés pour les essais de protection croisée. Quant à la culture proprement dite, nous suivront le protocole développé par (Vachiéry et al., 2006), la culture d'*E. ruminantium* sur cellules endothéliales se faisant déjà en routine au CIRDES. Les dose d'immunisation seront calibrées selon le protocole défini par (Vachiéry et al., 2006).

c. Typage des souches de terrain et de nouvelles souches identifiées

Le génotypage des souches se fera par MLST (Multilocus Sequence Typing). Le principe de la MLST consiste à considérer les séquences internes de 5 à 10 gènes de ménage, généralement impliqué dans le métabolisme de la bactérie. Les variations de séquences d'ADN observables sur chacun des gènes de ménage constituent un allèle distinct. Et pour chaque souche, la combinaison des différents allèles définit des séquences types (ST). C'est la définition de ces signatures génétiques (les ST) qui font de la MLST une méthode puissante de typage de la diversité génétique chez les isolats d'espèces bactériennes. Pour *Ehrlichia ruminantium*, huit (8) gènes marqueurs cibles ont été identifiés et les PCR les amplifiant sur le pathogène ont été mises au point (Adakal et al., 2009). Le génotypage MLST permettra alors de classer aussi bien les souches de terrain du Mali et du Bénin, que les souches du Burkina

Faso (les 8 souches isolées comprises) et d'établir un schéma exhaustif d'essais de protection croisée.

d. Etude du degré de protection croisée et standardisation des doses vaccinales

Le but de ces essais est de compléter les informations de protection croisée déjà disponibles afin d'éviter de mettre dans le même cocktail vaccinal des souches de même spectre de protection mais plutôt des souches assez différentes et complémentaires. Après l'analyse génétique des souches par MLST, 3 souches de génotypes différents seront testés en protection croisée. La souche Bekuy 242 sera une souche intégrée d'office dans le cocktail de souches vaccinales parce qu'elle a été testée sur le terrain et a permis une amélioration significative de l'efficacité du vaccin initial contenant la souche Gardel. Au préalable, les deux autres souches différentes génétiquement de Bekuy 242 par exemple, Banan 112 et Bekuy 255 seront étudiées en protection croisée. Des animaux vaccinés par Banan112 ou Bekuy 255 seront infectés avec Bekuy 242 et inversement des animaux vaccinés Bekuy 242 seront infectés avec Banan 112 et Bekuy 255 afin de vérifier le niveau de protection croisée et choisir entre Bekuy 255 et Banan 112.

Les essais de protection croisée seront mis en place à l'étable au CIRDES. Pour cela, des moutons naïfs et sensibles seront achetés au Nord du Burkina où la cowdriose n'existe pas. Les animaux seront constitués en lots de 4 animaux : 1 groupe immunisé contre Bekuy 242, 1 groupe immunisé contre Banan112, 1 groupe immunisé contre Bekuy 255 et 3 groupes de 3 animaux qui constituent le groupe contrôle infectés lors du challenge hétérologue par les 3 souches séparément.

Sur la durée des essais, les animaux seront suivis quotidiennement : il sera relevé l'état général de l'animal, la température et une prise de sang sera effectuée à intervalle d'une semaine à partir du jour de l'infection pour suivre la cinétique des anticorps témoins de l'évolution de la maladie et à la mort d'un animal, le cortex sera prélevé. Les signes cliniques observés seront décrits par l'attribution de score clinique tel que définis par (Pretorius et al., 2007), ce qui aidera à mesurer l'intensité de l'infection et à évaluer la capacité protectrice des souches immunisantes.

Suivant les résultats obtenus et la survie des animaux immunisés, et si la durée du projet le permet, les animaux seront mis au pâturage sur la ferme expérimentale de Banankéléda de manière à leur faire subir une infection naturelle par les tiques. Ce transfert aura lieu pendant la période d'activité des nymphes qui sont les plus impliquées dans la transmission de la maladie aux ovins. Dans ce cas aussi, un suivi quotidien sera effectué pour recueillir les

données cliniques et les mortalités. Les cortex des animaux morts seront également récoltés pour identifier les souches contre lesquelles l'immunisation n'a pas protégé.

Résultats attendus

Les résultats attendus sont donc : i) la structuration des populations d'*E. ruminantium* est établie à l'échelle sous-régionale du Burkina, du Mali et du Bénin ; ii) le potentiel vaccinal des souches locales du Burkina et des cocktails vaccinaux proposés est évalué; iii) des souches vaccinales sont proposées pour la mise au point d'un vaccin efficace utilisable à l'échelle de la sous-région.

Les résultats issus de ces travaux sont destinés à appuyer les programmes de lutte intégrée contre la cowdriose visant à faciliter l'établissement d'un état de stabilité enzootique, ce qui réduira considérablement les pertes dues à la cowdriose.

.

Références citées :

- Adakal, H., Bada-Alambéji, R., Stachurski, F., 2004. Etude de la variabilité antigénique d'*Ehrlichia ruminantium* dans la région sud-ouest du Burkina Faso en vue de l'application d'une vaccination. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales* 2, 132-137.
- Adakal, H., Meyer, D., Carasco-Lacombe, C., Pinarello, V., Allègre, F., Karine, H., Stachurski, F., Morand, S., Martinez, D., Lefrançois, T., Vachiéry, N., Frutos, R., 2009. MLST scheme of *Ehrlichia ruminantium*: Genomic stasis and recombination in strains from Burkina Faso. *Infect. Genet. Evol.* *in press*.
- Allsopp, M.T.E.P., Dorfling, C.M., Maillard, J.C., Bensaid, A., Haydon, D.T., van Heerden, H., Allsopp, B.A., 2001. *Ehrlichia ruminantium* Major Antigenic Protein Gene (*map1*) Variants Are Not Geographically Constrained and Show No Evidence of Having Evolved under Positive Selection Pressure. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 4200-4203.
- CIRDES, ITC 2005. Programme Concerté de Recherche-Développement sur l'Elevage en Afrique de l'Ouest (PROCORDEL). RAPPORT FINAL: janvier 2000 à mars 2005 par les assistants techniques et coordonnateurs à l'ITC et au CIRDES., p. 261pp.
- Collins, N.E., Liebenberg, J., de Villiers, E.P., Brayton, K.A., Louw, E., Pretorius, A., Faber, F.E., van Heerden, H., Josemans, A., van Kleef, M., Steyn, H.C., van Strijp, M.F., Zweygarth, E., Jongejan, F., Maillard, J.-C., Berthier, D., Botha, M., Joubert, F., Corton, C.H., Thomson, N.R., Allsopp, M.T., Allsopp, B.A., 2005. The genome of the

- heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 838-843.
- Collins, N.E., Pretorius, A., Van Kleef, M., Brayton, K.A., Zwegarth, E., Allsopp, B.A., 2003. Development of Improved Vaccines for Heartwater. Ann. N.Y. Acad. Sci. 990, 474-484.
- Farougou, S., Kpodekon, M., Adakal, H., Sagbo, P., Boko, P., 2007a. Abondance saisonnière des tiques (Acari : Ixodidae) parasites des ovins dans la région méridionale du Bénin. Revue Méd. Vét. 158, 627-632.
- Farougou, S., Kpodekon, M., Tassou, A.W.Y., 2007b. Abondance saisonnière des tiques (Acari : Ixodidae) parasites des bovins dans la zone soudanienne du Bénin : cas des départements du Borgou et de l'Alibori. Revue Africaine de Santé et de Productions Animales 5, 61-67.
- Farougou, S., Kpodekon, M., Tchabode, D.M., Youssao, A.K.I., Boko, C., 2006. Abondance saisonnière des tiques (acari : Ixodidae) parasites des bovins dans la zone soudanienne du Bénin : cas des départements de l'Atacora et de la Donga. Ann. Méd. Vét. 150, 145-152.
- Farougou, S., Toguebaye, B.S., Tounkara, K., Sy, D., Akakpo, A.J., 1998. Epidémiologie de la cowdriose au Bénin. 1- Etude préliminaire sur la présence du germe chez les tiques vectrices. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop 149, 953-958.
- Farougou s., 1998. Contribution à la connaissance de la cowdriose des ruminants. Thèse de 3ème cycle, N°28, Université de DAKAR, p. 101
- Frutos, R., Viari, A., Ferraz, C., Bensaid, A., Morgat, A., Boyer, F., Coissac, E., Vachiéry, N., Demaille, J., Martinez, D., 2006. Comparative Genomics of Three Strains of *Ehrlichia ruminantium*: A Review. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1081, 417-433.
- Frutos, R., Viari, A., Vachiéry, N., Boyer, F., Martinez, D., 2007. *Ehrlichia ruminantium*: genomic and evolutionary features. Trends in Parasitology 23, 414-419.
- Jongejan, F., 1991. Protective immunity to heartwater (*Cowdria ruminantium* infection) is acquired after vaccination with *in vitro* attenuated rickettsiae. Infect. Immun 59, 729-731.
- Mahan, S.M., Kumbula, D., Burrridge, M.J., Barbet, A.F., 1998. The inactivated *Cowdria ruminantium* vaccine for heartwater protects against heterologous strains and against laboratory and field tick challenge. Vaccine 16, 1203-1211.
- Marcelino, I., Vachiéry, N., Amaral, A.I., Roldão, A., Lefrançois, T., Carrondo, M.J.T., Alves, P.M., Martinez, D., 2007. Effect of the purification process and the storage

- conditions on the efficacy of an inactivated vaccine against heartwater. *Vaccine* 25, 4903–4913.
- Martinez, D., Maillard, J.C., Coisne, S., Sheikboudou, C., Bensaid, A., 1994. Protection of goats against heartwater acquired by immunisation with inactivated elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41, 153-163.
- Mukhebi, A.W., Chamboko, T., O'Callaghan, C.J., Peter, T.F., Kruska, R.L., Medley, G.F., Mahan, S.M., Perry, B.D., 1999. An assessment of the economic impact of heartwater (*Cowdria ruminantium* infection) and its control in Zimbabwe. *Prev. Vet. Med* 39, 173-189.
- Nyika, A., Barbet, A.F., Burrridge, M.J., Mahan, S.M., 2002. DNA vaccination with the map1 gene followed by protein boost augments protection against challenge with *Cowdria ruminantium*, the agent of heartwater. *Vaccine* 20, 1215–1225.
- Nyika, A., Mahan, S.M., Burrridge, M.J., McGuire, T.C., Rurangirwa, F., Barbet, A.F., 1998. A DNA vaccine protects mice against the rickettsial agent *Cowdria ruminantium*. *Parasite Immunol.* 20, 111–119.
- Pretorius, A., Collins, N.E., Steyn, H.C., van Strijp, F., van Kleef, M., Allsopp, B.A., 2007. Protection against heartwater by DNA immunisation with four *Ehrlichia ruminantium* open reading frames. *Vaccine* 25, 2316–2324.
- Pretorius, A., van Kleef, M., Collins, N.E., Tshikudoa, N., Louwa, E., Faber, F.E., van Strijpa, M.F., Allsopp, B.A., 2008. A heterologous prime/boost immunisation strategy protects against virulent *E. ruminantium* Welgevonden needle challenge but not against tick challenge. *Vaccine* 26, 4363–4371.
- Raliniaina, M., Meyer, D.F., Pinarello, V., Sheikboudou, C., Emboulé, L., Kandassamy, Y., Adakal, H., Stachurski, F., Martinez, D., Lefrançois, T., Vachiéry, N., 2008. Mining the genetic diversity of *Ehrlichia ruminantium* using map genes family. *Veterinary Parasitology*, doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.020.
- Reddy, G., Sulsona, C.R., Harrison, R.H., Mahan, S.M., Burrridge, M.J., Barbet, A.F., 1996. Sequence Heterogeneity of the Major Antigenic Protein 1 Genes from *Cowdria ruminantium* Isolates from Different Geographical Areas. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 3, 417-422.
- Simbi, B.H., Bowie, M.V., McGuire, T.C., Barbet, A.F., Mahan, S.M., 2006. Evaluation of *E. ruminantium* Genes in DBA/2 Mice as Potential DNA Vaccine Candidates for Control of Heartwater. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1078, 424–437.

- Totte, P., McKeever, D., Martinez, D., Bensaid, A., 1997. Analysis of T-cell responses in cattle immunised against heartwater by vaccination with killed elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. *Infect. Immun* 65, 236-241.
- Uilenberg, G., 1983. Heartwater (*Cowdria ruminantium* infection): current status. *Advances in veterinary Science and Comparative Medecine* 27, 427-480.
- Vachiéry, N., Lefrançois, T., Esteves, I., Molia, S., Sheikboudou, C., Kandassamy, Y., Martinez, D., 2006. Optimisation of the inactivated vaccine dose against heartwater and in vitro quantification of *Ehrlichia ruminantium* challenge material. *Vaccine* 24, 4747–4756.
- van Winkelhoff, A.J., Uilenberg, G., 1981. Cross-immunity studies with strains of *Cowdria ruminantium* isolated in West and South Africa. *Trop. anim. Hlth Prod* 13, 160-164.
- Zweygarth, E., Josemans, A.I., Steyn, H.C., 2008. Experimental use of the attenuated *Ehrlichia ruminantium* (Welgevonden) vaccine in Merino sheep and Angora goats *Vaccine* 26S, G34–G39.
- Zweygarth, E., Josemans, A.I., Van Strijp, F.M., Lopez-Rebollar, L., Van Kleef, M., Allsopp, B.A., 2005. An attenuated *Ehrlichia ruminantium* (Welgevonden stock) vaccine protects small ruminants against virulent heartwater challenge. *Vaccine* 23, 1695-1702.

Ethique/Utilisation d'animaux vivants :

Le type d'essais utilisés dans cette étude nous impose le recours fréquent à des animaux vivants pour valider les résultats. Toutefois, dans la majeure partie des cas, les animaux seront traités dès les premiers pics d'hyperthermie qui signalent le développement de la maladie. Aussi, ces animaux serviront pour la plupart dans la suite des expérimentations. Pour les animaux témoins, il n'est cependant pas possible de les traiter, mais il est prévu leur euthanasie lorsque l'évolution vers la mort est lente pour éviter la souffrance à l'animal.

Partenariat :

Trois institutions sont impliquées dans ce projet dont 2 du Sud et une du Nord. Il s'agit :

- du Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES) basé à Bobo-Dioulasso au Burkina Faso et porteur du projet ;
- de l'Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi du Bénin ;

- et du Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD) l'UM15 INRA/CIRAD « Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes »;

Le CIRDES assurera la coordination du projet, la conduite des activités de laboratoire (cultures cellulaires, extraction ADN, PCR et séquençage des souches) et des essais de protection croisée. L'EPAC assurera la collecte des échantillons au Bénin tandis qu'au Mali, une équipe du CIRDES y sera déployée. Elle travaillera certes en collaboration avec les services vétérinaires locaux. Les collègues du CIRAD assureront l'aide au niveau de développement de la culture cellulaire et de l'analyse poussée des données de séquences.

Valorisation des résultats :

Les résultats issus de ces travaux de recherche feront d'abord l'objet de restitution sur le terrain auprès des éleveurs qui seront impliqués dans la conduite des essais sur le terrain. C'est en effet, une démarche que nous appliquons déjà avec les éleveurs des trois villages cibles du Burkina Faso.

L'ensemble des résultats obtenus et de la démarche suivie fera l'objet de rapports (annuels et final) puis publiés dans des revues en ligne. Les résultats les plus concluants seront publiés dans des revues scientifiques internationales à comité de lecture.

Propriété intellectuelle et exploitations des résultats

Les données acquises sont la propriété commune des partenaires (CIRDES, EPAC, CIRAD). Les publications feront l'objet d'un échange et d'une finalisation commune. Le nom de tous les chercheurs ayant participé à l'acquisition, au traitement des données et à la rédaction devra apparaître sur chaque publication, ainsi que celui de l'institution à laquelle ils appartiennent. Le sigle des trois partenaires sera mentionné sur les rapports de synthèse du projet.

CALENDRIER D'EXECUTION DES ACTIVITES

[illegible]

Résumé

La cowdriose empêche en Afrique subsaharienne, l'importation de races bovines et ovines plus productives et condamne les éleveurs à une production de faible valeur ajoutée. La façon la plus efficace pour protéger les troupeaux serait de développer une stratégie vaccinale efficace. Nous avons délimité un territoire d'étude précis en zone d'enzootie, la région de Békuy. Nous avons d'abord évalué par protection croisée, le potentiel vaccinal des souches Welgevonden et Gardel puis réalisé des essais vaccinaux sur le terrain. La protection est limitée et variable selon les sites. L'ajout d'une souche locale, Bekuy 242, augmente significativement la protection. Maladie vectorielle, la dynamique de la cowdriose est influencée par celle du vecteur *Amblyomma variegatum*. Le comportement des tiques ainsi que les méthodes de lutte couramment utilisées par les éleveurs du Burkina Faso ont été analysés. L'utilisation des acaricides est anarchique mais aucune résistance n'est détectée. L'étude du comportement des nymphes d'*A. variegatum* a permis d'envisager une gestion raisonnée des déplacements des bovins en saison sèche. Ceci a débouché sur un plan d'échantillonnage précis sur la zone d'étude permettant d'étudier la diversité génétique des souches d'*E. ruminantium*. Un schéma MLST a été développé et appliqué aux souches récoltées sur deux années. L'analyse statistique du polymorphisme ADN et des profils évolutifs a montré qu'il existe une population en stase génomique à partir de laquelle une population en expansion rapide a récemment émergé de façon clonale. Une stratégie vaccinale à l'échelle régionale voire locale serait mieux adaptée et un projet de recherche en ce sens est intégré à la thèse.

Mots clés:

Ehrlichia ruminantium – Diversité génétique – Cowdriose – Vaccination – MLST – *Amblyomma variegatum* – Stability enzootique – Burkina Faso

Summary

Heartwater contributes in Sub-Saharan areas to the reduction of stockbreeders' income. Indeed, exotic cattle or Sahelian sheep introduce in enzootic area in order to increase local livestock production face mortalities due to the disease. The most effective way to protect susceptible animals would be to develop an effective vaccine strategy. We delimited a study area and assessed by cross-protection, the efficacy of the Welgevonden and Gardel vaccines and then carried out field vaccination trials. Adding the local strain Bekuy 242 to Gardel increased protection significantly. Heartwater being a vector-borne disease, the control of ticks to a sound threshold would reduce the transmission and would ensure the establishment of enzootic stability. The analysis of current tick control practices in Burkina Faso showed that no rule applies. However, no resistance has been reported yet. Drop-off behaviour of nymphs was analysed and led to an optimised management of alternate grazing on community pasture to reduce cattle infestation during the rainy season by adult ticks and, consequently, acaricide treatments. This led to a specific sampling scheme within the study zone to analyse the genetic diversity and evolutionary patterns of *E. ruminantium*. A MLST scheme was developed and applied to strains collected over two year. Statistical analysis of DNA polymorphism and evolutionary trends showed that there is a core population in genomic stasis from which a population in fast expansion has recently emerged in a clonal way. Implementing a regional, or even a local, vaccine strategy might be more relevant and corresponding research grant proposal is attached to the thesis.

Key words :

Ehrlichia ruminantium – Genetic diversity – Heartwater – Vaccination – MLST – *Amblyomma variegatum* – Enzootic stability – Burkina Faso